

Immuunigeenien ilmentyminen *Heliconius erato* - perhosella kosteusolosuhteiltaan poikkeavissa luonnonpopulaatioissa

Lisa Gawriyski
Pro gradu -tutkielma
Helsingin yliopisto
Biotieteiden laitos
Syyskuu 2018

Tiivistelmä

Elämänhistorian tutkimus keskittyy selvittämään ja selittämään kuinka luonnonvalinta ja ympäristön olosuhteet vaikuttavat organismin kelpoisuuteen. Vahva immuunipuolustus on energieettisesti raskas ylläpitää ja saattaa vaikeuttaa toisten hyödyllisten ominaisuuksien ylläpitoa. Vahvan immuunipuolustuksen ylläpito tilanteissa, joissa sitä ei tarvita saattaa vaikuttaa kelpoisuuteen negatiivisesti. Tässä tutkimuksessa selvitettiin eroavatko immuunipuolustusta kuvaavat mitat eri kosteusolosuhteista peräisin olevilla *Heliconius erato* -perhosilla. *Heliconius erato* on neotrooppinen perhoslaji, joka on laajalle levinnyt laji Etelä-Amerikassa. Perhosen elämänhistorian ominaisuuksia, immuunipuolustusta ja immuniteetin vaihtelua eri ympäristöolosuhteissa on tutkittu lajilla vähän. Ympäristön kosteusolosuhteet vaikuttavat mikrobien ja sienien määrään, laatuun ja moninaisuuteen. Immuunigeenien ilmentymistä mitattiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR-menetelmällä (RT-qPCR) luonnosta kerätystä *H. erato* -näytteestä. Näytteet kerättiin kosteusgradientiltaan kuivista, keskiverroista ja kosteista olosuhteista. Myös fysiologista immuniteettia mittaavan enkapsulaatiokokeen tuloksia vertailtiin kosteusolosuhteissa. Tutkimustulosten perusteella antimikrobiaalisen peptidin attasiinin geeni-ilmentyminen on huomattavasti vähäisempää kuivissa kuin kosteissa tai keskiverroissa olosuhteissa. Enkapsulaatiokoe ei näyttänyt eroa kosteusolosuhteiden välillä. Naaraiden ja koiraiden välillä todettiin ero profenolo-oksidaasin geeni-ilmentymisessä. Kaiken kaikkiaan, tulokset kuvaavat mahdollista eroa immuuniuhkien välillä eri olosuhteissa, mutta aihe vaatii lisää tutkimusta.

Avainsanat: *Heliconius erato*, vastustuskyky, qPCR, kosteus, attasiini, antimikrobiaalinen peptidi

Abstract

Life history research seeks to explain how natural selection and ecological challenges shape organisms to optimize their fitness. A strong immune defense is energetically demanding to upkeep and there may be trade-offs among other life history traits. Investing a lot of energy to upkeep a strong immune defense in conditions where there are less pathogens and parasites might have negative fitness effects. *Heliconius erato* is a neotropical species of butterfly found widely in South America. The immune defense, ecological factors affecting its immune defense, and possible life history trade-offs of the butterfly are currently not well known. Environmental moisture conditions have been shown to affect the diversity, quality and amount of microorganisms and parasites. The aim of this thesis was to use real-time quantitative PCR (RT-qPCR) to quantify immune gene expression of individuals of the butterfly species *Heliconius erato* collected from different environmental moisture conditions. Additionally, individual variation in encapsulation rates, a physiological measure of immunity, was compared across the moisture gradient. Results indicate reduced expression of the gene encoding the antimicrobial peptide attacin in dry conditions, but no difference in encapsulation rates across the moisture gradient. Additionally, differential expression of the prophenoloxidase encoding gene was found between male and female butterflies. These results indicate a possibility of differential immune threats in different environmental moisture conditions in *H. erato*, but requires further study.

Keywords: *Heliconius erato*, immune defense, qPCR, moisture, attacin, antimicrobial peptide

Sisällysluettelo

Immuunigeenien ilmentyminen <i>Heliconius erato</i> -perhosella kosteusolosuhteiltaan poikkeavissa luonnonpopulaatioissa	1
Tiivistelmä	2
Abstract	3
Sisällysluettelo	4
Lyhenteet	7
1. Johdanto	8
2. Kirjallisuuskatsaus	9
2.1. <i>Heliconius</i> -perhoset	9
2.2. Ympäristötekijöiden vaikutus immuunipuolustukseen	11
2.3. Hyönteisten immunitetti	13
2.3.1. Humoraalinen immuunipuolustus	14
2.3.1.1. Yleiskuva	14
2.3.1.2. Imd	16
2.3.1.3. Toll	17
2.3.1.4. Antimikrobiaaliset peptidit	18
2.3.2. Soluvälitteinen immuunipuolustus	20
2.3.2.1. Yleistä	20
2.3.2.2. Enkapsulaatio	21
2.4. Menetelmien tausta	22
2.4.1. Enkapsulaatiokoe	22
2.4.2. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR)	23
2.4.2.1. SYBR Green I	24
2.4.2.2. MIQE	24
2.4.3. Biotietokannat ja laskennalliset työkalut	25
2.4.4. qPCR-töissä käytettävät laskennalliset työkalut	26
2.4.4.1. GeNorm	26
2.4.4.2. NormFinder	27
2.4.4.3. RefFinder	27
3. Tavoitteet	27
4. Aineisto ja menetelmät	28
4.1. Työssä käytettävät perhoset	28
4.2. Perhosten käsittely	30

4.3. RNA-eristys ja laadunarviointi	30
4.3.1. Näytteiden preparaatio eristykseen	30
4.3.2. Näytteiden homogenisaatio	30
4.3.3. RNA-eristys	31
4.3.4. Etanolipesut	31
4.3.5. Laadunarviointi	31
4.4. cDNA-synteesi ja laadunarviointi	32
4.4.1. DNAasi -käsittely	32
4.4.2. cDNA-synteesi	32
4.5. Keskeisten geenien valinta ja alukkeiden suunnittelu	33
4.5.1. Vertailugeenit	33
4.5.2. Kohdegeenit	35
4.5.3. Alukkeiden suunnittelu	36
4.6. qPCR-työn suunnittelu, toteutus ja laadunarviointi	39
4.6.1. qPCR-työssä käytetyt laitteet ja reagenssit	39
4.6.2. Gradientti-qPCR	40
4.6.3. Standardisuora-ajot	40
4.6.4. Vertailugeenien testaus ja valinta	41
4.6.5. qPCR-työ ja laaduntarkkailu	42
4.7. qPCR-tulosten analysointi	42
4.7.1. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metodi	42
4.7.1.1. Normalisointi	43
4.7.1.2. Hajonta ja keskivirhe	43
4.7.1.3. Tilastollinen testaus	45
5. Tulokset	46
5.1. RNA-eristys	46
5.2. cDNA-käännös	46
5.3. qPCR-työn vaiheet	47
5.3.1. Gradientti-qPCR	47
5.3.2. Standardisuora	47
5.3.3. Kontrolligeenien valinta	47
5.3.3.1. Kontrolligeenien qPCR-ajo	47
5.3.3.2. GeNorm	49
5.3.3.3. NormFinder	49
5.3.3.4. RefFinder	49
5.3.3.5. Valittu vertailugeenipari	49
5.4. Vertailugeenien vakaus tutkimusaineistossa	50
5.5. Tutkimusaineiston normaalijakautuneisuus	51

5.5.1. ΔC_t -arvot	51
5.5.2. Enkapsulaatioarvot	54
5.6. Immuunigeenien ilmentymistasot	55
5.6.1. Kosteusolosuhteiden vertailu	55
5.6.2. Sukupuolten välinen vertailu	60
5.7. Enkapsulaatiokoe	62
5.7.1. Enkapsulaatioarvot olosuhteittain	62
5.7.2. Enkapsulaatioarvojen ja immuunigeenien ilmentymisen välinen suhde	63
6. Tulosten tarkastelu	63
6.1. Immuunigeenien ilmentymistasot	63
6.2. Enkapsulaatiokoe	66
6.3. Tutkimusasetelman mahdolliset ongelmat	67
6.3.1. Kosteusolosuhteet	67
6.3.2. Normalisointi qPCR-työssä	68
6.4. Yhteenveto	68
7. Tulevaisuus	69
8. Kiitokset	69
Lähteet:	71

Lyhenteet

βGRP	Beta-1,3-glukaania sitova proteiini (beta-1,3-glucan-binding protein)
AMP	Antimikrobiaalinen peptidi
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
EF1	Elongation factor 1
eIF4A	Eukaryotic initiation factor 4A
GNBP	Gram-negatiivisia mikrobeja sitova proteiini (Gram-negative binding proteins)
<i>H. erato</i>	<i>Heliconius erato</i>
<i>H. melpomene</i>	<i>Heliconius melpomene</i>
Imd	Immune Deficiency
JAK/STAT	Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription
<i>M. sexta</i>	<i>Manduca sexta</i>
PAP	Profenoloksidaasia aktivoivat proteiinit
PGRP	Tunnistajaproteiini (Pattern Recognition Protein)
PO	Fenoloksidaasi
ProPO	Profenoloksidaasi, fenoloksidaasin zymogeeni
PRR	Tunnistajareseptori (Pattern Recognition Receptor)
qPCR	Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR
Rp	Ribosomaalinen proteiini (esim. RpS3, RPL10)

1. Johdanto

Yksilön elämänhistoria on usean tekijän summa, jossa tasapainotellaan useita selviytymisen ja lisääntymismenestyksen kannalta tärkeitä tekijöitä. Pohjimmiltaan elämänhistoria on optimisaatio-ongelma: kun yksilöllä on käytettävissään tietty määrä resursseja ja sitä kohtaa tietty määrä uhkia, mitkä valinnat tuottavat parhaan kelpoisuuden? Elämänhistorian tutkimus keskittyy selvittämään miten luonnonvalinta ja ympäristötekijät vaikuttavat yksilön kykyyn selvitä ja saada jälkeläisiä. Suoja patogeenejä ja parasiitteja vastaan on tärkeä osa elämänhistoriaa ja vaihtelee lajista, perimästä, ajasta, paikasta ja muista ympäristötekijöistä riippuen. Yksilöiden vastustuskykyä on tutkittu laajasti useassa lajissa, ja on todettu suurta vaihtelua yksilöiden, ympäristöjen ja eri elämäntilanteiden välillä.

Vahva vastustuskyky vaatii energian ja resurssien käyttöä immuuniproteiinien valmistukseen ja ylläpitoon. Vastustuskyvyllä on siis evolutiivinen hinta, ja vahva immunitetti ei ole aina yksilölle hyödyllinen asia. Hyöty vahvan vastustuskyvyn ylläpidosta riippuu paljolti yksilön ympäristöstä. Ympäristössä, jossa patogeenejä on paljon vahva immunitetti on selviytymisetu, joka mahdollistaa lisääntymismenestyksen. Jos patogeenejä on vähän, ei vastustuskykyyn ole syytä käyttää yhtä paljon resursseja. Abioottiset ympäristötekijät, kuten lämpötila tai kosteus, vaikuttavat hyönteisten käyttäytymiseen, immunitettiin ja ääritapauksissa fysiologiaan (Khaliq et al. 2014). Lisäksi, abioottiset ympäristötekijät vaikuttavat bioottisten uhkien, kuten sienten, parasiittien ja bakteerien, määrään, laatuun ja virulenssiin (Borowik & Wyszowska 2016, Mishra et al. 2015). Ympäristön kosteuden vaikutuksesta immunitettiin on suhteellisen vähän tutkimustuloksia, mutta muiden ympäristötekijöiden, kuten esimerkiksi lämpötilan vaikutuksesta on laajamittaista tietoa (Murdock et al. 2012). Kosteat olosuhteet vaikuttavat mikrosporidioosin tarttumistiheyteen ja taudin intensiteettiin *Bombyx mori* -koiperhosessa voimakkaammin kuin muut ympäristömuuttujat (Rahmathull et al. 2012). Maaperän kosteus vaikuttaa positiivisesti myös mikrobien aiheuttaman maahengityksen määrään ja näin hiilidioksidin ja useiden ravintoaineiden saatavuuteen (Moyano et al. 2013, Hawkes et al. 2017).

Heliconius-perhosia on tutkittu evoluutiobiologian alalla laajasti (Merrill 2015, Arias et al. 2016, Jiggins 2017). Tutkimus on ensisijaisesti kohdistunut perhosten siipien väreihin ja muotoihin, ja lajien väliseen laajamittaiseen siipikuvioiden matkintaan (engl. Müllerian mimicry). *Heliconius*-perhosten toukat ovat erikoistuneet syömään myrkyllisiä kärsimyskukkia (*Passiflora*). *Heliconius*-lajit ovat tyypillisesti saalistajille erittäin pahanmakuisia, joten saalistajat oppivat välttämään niiden kirkasvärisiä siipikuvioita (Arias et al. 2016). Tämän tutkimuksen kohteena ovat *Heliconius erato* -perhoset. *Heliconius erato* on lajina suhteellisen vähän tutkittu. Erikoisesti elinolosuhteiden vaikutuksesta eri elämänhistorian ominaisuuksiin tiedetään vähän.

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää ympäristön kosteustason vaikutusta perhosten vastustuskykyyn tutkimalla valikoitujen immuunigeenien ilmentymistasoa.

Kosteusolosuhteiden vaikutusta *H. erato* -perhosen immuniteettiin ei ole aiemmin tutkittu. Perhoset on kerätty elinympäristön kosteusgradientin eri kohdilta: kuivasta, keskiverrosta ja kosteasta elinympäristöstä.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1. *Heliconius*-perhoset

Lepidoptera-lahko eli perhoset on laaja hyönteislahko, joka jaetaan yli 127 heimoon.

Perhosen elämään kuuluu useita eri elämänvaiheita, mukaan lukien täydellinen muodonmuutos. Perhonen aloittaa elämänsä munana, kehittyy toukaksi, joka koteloituu ja kehittyy täysikasvuiseksi perhoseksi. *Heliconius*-perhosten siipikuviot ovat värikkäitä ja toimivat varoituksena perhosten syömäkelvottomuudesta mahdollisille saalistajille (Arias et al. 2016). Eri *Heliconius*-lajien välillä on myrkyllisyyseroja, ja monet vähemmän myrkylliset lajit matkivat todella myrkyllisten lajien siipikuvioita (Arias et al. 2016).

Heliconius-perhoset ovat perhosiksi pitkäikäisiä, ne elävät keskimäärin 6-8 kuukautta (Turner 1971). Toisin kuin useat muut perhoslajit, täysikasvuiset naaraat tuottavat munia päivittäin koko elämänsä ajan (Jiggins 2017, 47). *Heliconius*-perhoset lentävät suhteellisten

pienien tunnettujen alueiden ja reittien sisällä (Turner 1971, katsaus Jiggins 2017 ja de Castro 2018). Naaraat näyttävät oppivan ravintokasvien paikan ja etsivät parasta mahdollista munimispaikkaa pitkiäkin aikoja (Benson 1978).

Heliconius-perhosten toukat kehittyvät munasta toukaksi keskimäärin 2-3 viikossa (McMillan, Jiggins & Mallet 1997). Kärsimyskukat (*Passiflora*) ovat *Heliconius*-perhosten pääasiallisia ravintokasveja. Vastaavasti *Heliconius*-perhoset ovat kärsimyskukkien pääasiallinen tuholainen. *H. erato* -toukat kykenevät käyttämään ravinnokseen useita eri *Passiflora*-suvun kasveja. *H. erato* -toukat ovat myös erittäin kannibalistisia, minkä takia *H. erato* -naaraat eivät muni useita munia lähekkäin (Jiggins 2017, 33-34). Toukkien kuolleisuus on korkea; muurahaiset ja erilaiset parasitoidit tappavat suuren määrän toukkia (Jiggins 2017, 41-42). Kärsimyskukat ovat syanogeenisiä kasveja. *Heliconius*-toukat ovat erikoistuneet hajottamaan ja eristämään *Passiflora*-kasvien syanogeenisiä myrkkyjä (Jiggins 2017, 36-38). *Passiflora*-kasvin myrkyllisyystaso vaikuttaa sitä syövän *H. erato* -toukan myrkyllisyyteen (Hay-Roe & Nation 2007), mutta *H. erato* kykenee myös syntetisoimaan syanogeenisiä itse, joten sen myrkyllisyys ei ole täysin riippuvainen ravintokasvista (Engler-Chaouat & Gilbert 2007). *Heliconius*-lajit neutralisoivat myrkkyjä muun muassa estämällä *Passiflora*-kasvien beta-glukosidaasientsyymien toimintaa (Jiggins 2017, 36-38).

Toukkien ruokakasvien kemiallisten ominaisuuksien ja luontaisen mikrobiston vaikutusta toukkien selviytymiseen on tutkittu useissa *Lepidoptera*-lajeissa. Ravinnon laadulla, erityisesti korkeaproteiinisella ruokavaliolla, on positiivinen vaikutus immunitettiin (Shikano 2017). Ruokakasvien kemiallisten ominaisuuksien, kuten tuholaissuoja-aineiden, on joissakin tutkimuksissa osoitettu vaikuttavan immunitettiin negatiivisesti ja toisissa positiivisesti (Shikano 2017). Esimerkiksi yhdessä tutkimuksessa korkeamyrkkyisissä ruokakasveissa kasvaneiden *Junonia coenia* -perhosen toukkien vastustuskyky oli korkeampi kuin vähämyrkkyisissä kasveissa kasvaneiden (Smilanich et al. 2018), mutta tutkijat ovat löytäneet samalla lajilla myös vastakkaisia tuloksia (Smilanich et al. 2009).

2.2. Ympäristötekijöiden vaikutus immuunipuolustukseen

Ekoimmunologiassa tutkitaan ympäristön ja lajien immunitetin vuorovaikutusta. Tutkimusten mittareina käytetään immunitettia kuvaavia numeerisia muuttujia, kuten immuuniproteiinien pitoisuutta, ja niitä verrataan kelpoisuutta kuvaaviin tekijöihin, kuten selviytymiseen patogeenialtistuksesta. Vahvan vastustuskyvyn eri komponenttien valmistus ja ylläpito vaatii yksilöltä huomattavan määrän resursseja (Seppälä 2015). Hyönteisen immunitetin taso riippuu useista tekijöistä, kuten ravintoaineiden saatavuudesta, sukupuolesta, iästä, hyönteisen ympäristöstä, siihen kohdistuvista immuuniuhista, sekä immunitetin ylläpidon hinnasta yksilölle (Schmid-Hempel 2005). Olosuhteiden muutosten, dispersaalin, pakenemisen ja muun fyysisen työn on osoitettu vaikuttavan negatiivisesti immunitetin tasoon (Adamo et al. 2008). Dispersaali on yksilöiden aktiivista tai passiivista siirtymistä niiden syntymäpaikasta toiselle alueelle. Vastaavasti investointi vahvaan immunitettiin voi vaikuttaa negatiivisesti muihin suorituksiin (Adamo et al. 2008, Schmid-Hempel 2005). Joissakin hyönteislajeissa vaikutus on päinvastainen, eli dispersaali nostaa hyönteisten immunitetin tasoa (Saastamoinen & Rantala 2013). Isot elämänhistorian tapahtumat, kuten parittelu, saattavat vaikuttaa hetkittäisesti vastustuskyvyn tasoon (Schmid-Hempel 2005). Vastustuskyvyn antama selviytymisetu riippuu yksilöön tai populaatioon kohdistuvista useista rinnakkaisista paineista: resurssien määrästä ja ympäristön olosuhteista, patogeenien ja parasiittien määrästä, virulenssista ja perinnöllisistä tekijöistä (Seppälä 2015). Vastustuskykyä ei voi ajatella yhtenä kokonaisuutena, vaan vastustuskyvyn eri tekijät ovat erilaisen paineen alla myös saman populaation sisällä (Langeloh et al. 2016).

Ekoimmunologisessa tutkimuksessa käytetyt teoreettiset mallit usein ennustavat keskitason immunokompetenssin olevan selviytymisetu vahvaan tai heikkoon immunitettiin verrattuna (Seppälä 2015). Käytännön kokeissa suhde ei ole niin selvä. Tutkimukset eri lajeilla viittaavat siihen, että erilaiset immuunitekijätasot ovat usein positiivisen suuntaavan valinnan kohteena (Seppälä 2015, Langeloh et al 2016). Immuunitekijöiden määrä siis korreloi usein selviytymisen kanssa niin, että immuunitekijätasojen nousu nostaa immuuniuhkasta selviytymisen todennäköisyyttä (Seppälä 2015). Tutkimukset ovat myös osoittaneet eroja immuunitekijöiden välillä. Joihinkin immuunitekijiin kohdistuu

positiivista valintaa, kun taas samassa organismissa toisiin immuunitekijöihin kohdistuu tasoittavaa tai negatiivista valintaa (Seppälä 2015, Langeloh et al. 2016).

Vastustuskykyä on vaikea mallintaa ja määritellä, koska se on itsessään monitekijäinen järjestelmä. Yksilöiden välillä on sisäisiä eroja, ja lisäksi useat ulkoiset tekijät vaikuttavat vastustuskykyyn. Useat ympäristötekijät vaikuttavat sekä yksilön käyttäytymiseen, että immunitettiin. Parasiittien ja patogeenien määrä vaihtelee merkittävästi eri ympäristöissä ja eri vuodenaikoina, joten vaihtelut tutkimustuloksissa voivat johtua siitä, että tutkimuksen kohteena olevat proteiinit ja geenit eivät vastaa lajiin sillä hetkellä kohdistuviin uhkiin (Seppälä 2015). Pohjimmiltaan yksittäisen hyönteisen jokainen teko sisältää infektoriskin, ja eri elämänvaiheet johtavat erilaisten immuunigeenien ilmentymiseen (Wu et al. 2016). Esimerkiksi, *Gryllus texensis* -sirkassa lämpötilan nousun on osoitettu vaikuttavan munimismäärään, nopeampaan kehittymiseen, korkeampaan painoon ja vastustuskyvyn nousuun (Adamo & Lovett 2011).

Yksi ympäristötekijä, joka mahdollisesti vaikuttaa hyönteisten kohtaamiin immuuniuhkiin ja hyönteisten immuunitasoon on ympäristön kosteustaso. Maaperän kosteus vaikuttaa kasvien ja mikro-organismien määrään ja laatuun (Borowik & Wyszowska 2016). Kosteissa maaperissä on moninaisempi mikrobisto kuin kuivissa, mutta myös liiallinen kosteus vähentää mikrobistoa (Borowik & Wyszowska 2016). Mikrobit, parasiitit ja sienet suosivat erilaisia maaperän ja ilmaperän kosteuksia, lajista riippuen (Borowik & Wyszowska 2016). Maaperän mikrobiston laadun ja määrän pääasiallinen määrittäjä on kuitenkin maaperän laatu, koska kosteus vaihtelee paljon kausittain (Borowik & Wyszowska 2016). Eri tutkimuksissa on selvitetty erityisesti lämpötilan ja ympäristön kosteuden yhteisvaikutusta immunitettiin.. Eräässä tutkimuksessa ympäristön korkea kosteus lyhensi koteloitumisaikaa ja nosti kuolleisuutta *Ephesia kuehniella* -toukissa (Mostafa et al. 2005). Vastaavasti *Musca domestica* -kärpäsen kuolleisuus sienipatogeenialtistukseen kasvaa merkittävästi ympäristön kosteuden kasvaessa erityisesti 20 - 35 asteen lämpötiloissa. Tätä alemmissa ja korkeammissa lämpötiloissa lämpötilan vaikutus kuolleisuuteen oli suurempi kuin kosteuden (Mishra et al. 2015). Vastaavia tuloksia ovat löytäneet myös Fargues & Luz (2000). Tarkat lämpötilat ja kosteudet

vaihtelevat patogeenien ja kohdelajien välillä. Maaperän korkea kosteus lisää parasiittisten sukkulamatojen aiheuttamia kuolemia *Ceratis capitata*- (Rohde et al. 2010) ja *Anastrepha ludens* -kärpäksillä (Toledo et al. 2014) Ympäristön ja maaperän korkea kosteus nostaa kuolleisuutta sieniparasiittiin *Lymantria dispar* -koiperhosessa (Reilly et al. 2014). Maaperän kosteuden tiedetään vaikuttavan positiivisesti parasiittien ohella myös bakteerien ja sienten määrään (Zumsteg et al 2013, Zhang et al 2014).

2.3. Hyönteisten immunitaetti

Toisin kuin nisäkkäillä, hyönteisillä on ainoastaan luontainen immunitaetti, joka jakautuu soluvälitteisiin tekijöihin ja humoraalisiin tekijöihin. Immuunivaste on humoraalisen ja soluvälitteisen immunitaetin yhteistyötä, jossa molemmat järjestelmät toimivat samanaikaisesti. Immuunipuolustukseen kuuluu lisäksi fysiologisia suojarakenteita kuten suojaavat epiteelirakenteet, ruumiinkammiot, hemosyyttien nopea aggregaatio, haavojen melanisaatio ja sytotoksisten molekyylien tuotanto infektiio- tai haava-alueella (Lavine & Strand 2002). Perhosilla on myös ruuansulatuselimistössä rikas mikrobiomi, joka vahvistaa vastustuskykyä (Wu et al. 2016). Hyönteisten verenkierto on avoin. Selkärangattomien avoimen verenkierron kudostilanteen ja veren sekoitus (hemolymfa) kiertää vapaasti ruumiinontelon osissa ja osittain suoniston ulkopuolella sekä ympäröi elimiä ja kudoksia. Avoin verenkierto mahdollistaa hemosyyttien ja immuunitekijöiden nopean lokalisaation infektiotalueelle (Dubovskiy et al. 2016). Samalla avoin rakenne mahdollistaa patogeenien nopean leviämisen (Dubovskiy et al. 2016). Bakteeri-infektiot leviävät usein haavaumista, mutta parasiitit ja sieni-infektiot eivät vaadi haavaumaa tunkeutuakseen hyönteisten ruumiinonteloon (Wu et al. 2016). Virusinfektiot leviävät erityisesti ruuansulatuselimistön kautta (Wu et al. 2016).

Drosophila melanogaster on immunitaettiltaan tutkituin hyönteinen. Suurin osa immuunijärjestelmistä hyönteisissä on kuvattu ensin *Drosophila melanogaster* -lajissa ja vasta myöhemmin muissa hyönteislajeissa. *Lepidoptera*-lahkon immunitaettia on tutkittu laajemmin kahdessa lajissa. *Bombyx mori* ja *Manduca sexta* ovat immunitaettiltaan tutkituimpia *Lepidoptera*-lajeja. *Lepidoptera*-lahkon lajien ja *D. melanogaster* -lajin immunitaetti on monilta osin samanlainen, mutta siinä on myös joitakin huomattavia eroja

(Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013). *Heliconius*-suku ei ole laajasti tutkittu immunitaattinsa osalta. Immuunijärjestelmän geenit ovat kovan muutospaineen alla, joten ne eroavat sekvenssiltään lähisukulaistenkin välillä enemmän kuin muut geenit (Unckless & Lazarro 2016). Immuunijärjestelmän ominaisuudet ja osat ovat osin perinnöllisiä, ja ne vaihtelevat sukulinjojen välillä (Schmid-Hempel 2005).

2.3.1. Humoraalinen immuunipuolustus

2.3.1.1. Yleiskuva

Humoraalisen puolustuksen tunnistusproteiinit tunnistavat tiettyjä taudinaiheuttajien konservoituneita molekyyliarakenteita, ja käynnistävät immuunivasteen patogeeneja vastaan. Yleisesti tunnistettavia konservoituneita molekyyliarakenteita ovat esimerkiksi bakteerien soluseinän lipopolysakkaridit, peptidoglykaanit ja beta-1,3-glukaanit. Kolme tärkeintä immuunivasteen sytokiinireseptorirataa ovat Toll, Imd (Immune Deficiency) ja JAK/STAT (Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription). Ratojen aktivaatio johtaa spesifisten immuunivasteen geenien lisääntyneeseen ilmentymiseen ja antimikrobiaalisten peptidien (AMP), signaalimolekyylien ja happiradikaalien tuotantoon. (Dubovskiy et al. 2016)

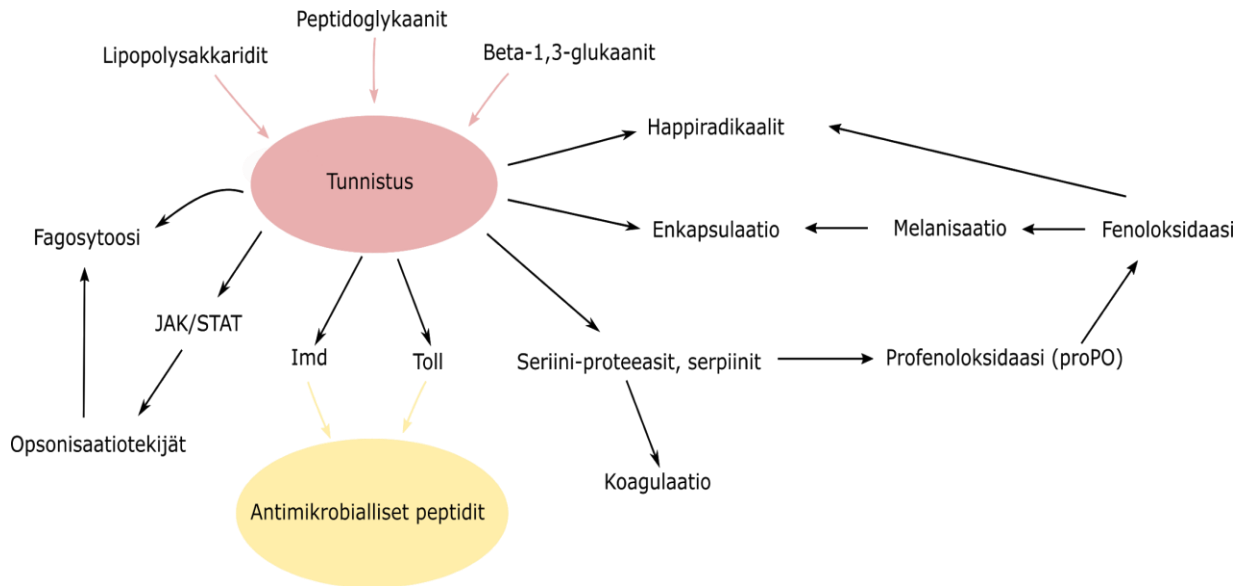
Patogeenien tunnistus perustuu suurten tunnistusreseptoriproteiiniyrihmien toimintaan.

Tunnistajareseptoriproteiineja (pattern-recognition receptors, PRR) on vapaina hemolymfassa sekä sitoutuneina hemosyyttien solukalvoon (Strand 2008).

Tunnistajaproteiinit tunnistavat hyvin yleisiä bioottisten uhkien rakenteita (Kuva 1).

Peptidoglykaania tunnistavat proteiinit (Peptidoglycan recognition proteins (PGRP:t)) tunnistavat ja sitovat peptidoglykaania, joka on Gram-positiivisten bakteerien soluseinän komponentti. Gram-negatiivisten bakteerien sitomisproteiinit (Gram-negative binding proteins (GNBP:t)) sitovat bakteriaalisia lipopolysakkarideja ja beta-1,3-glukaania. Lisäksi puolustukseen osallistuvat erilaiset thioesteriproteiinit, lektiinit ja serpiinit, sekä muita immuunipuolustuksen proteiineja (Hoffman 2003, Dubovskiy et al. 2016). Toll-rata aktivoituu erityisesti kun Gram-positiivisia bakteereita ja sienipatogeeneja tunnistetaan, Imd-rata aktivoituu Gram-negatiivisia bakteereja tunnistettaessa ja JAK/STAT-rata

aktivoituu sieni- ja virusinfektioissa (Strand 2008, Dubovskiy et al. 2016). Ratojen aktivaatio johtaa antimikrobiaalisten peptidien tuotantoon (Kuva 1). Antimikrobiaalisten peptidien lisäksi hyönteisten immuunipuolustus tuottaa patogeeneille myrkyllisiä happi- ja typpiradikaaleja (Kuva 1). Esimerkiksi kaksoisoksidaasin (dual oxidase) määrä kasvaa *D. melanogaster*- ja *B. mori* -lajeissa bakteeri-infektion seurauksena (Wu et al. 2106).



Kuva 1. Yleiskuva hyönteisten immuunipuolustuksesta (muokattu Schmid-Hempel 2005 pohjalta). Tunnistajaproteiinit tunnistavat yleiset patogeeneien solukalvorakenteet, kuten peptidoglykaanit ja lipopolysakkaridit. Tunnistajaproteiinit käynnistävät useita immuunipuolustuksen vasteita, jotka johtavat erilaisiin kemiallisiin ja fysiologisiin ilmiöihin.

Tutkimukset osoittavat eroja hyönteisten immuunivasteen aktivaatiossa lajien välillä. Muun muassa *Lepidoptera*-lajien PRR:t eroavat merkittävästi vastaavista *D. melanogaster* -kärpäsen PRR:stä. *Lepidoptera*-lajien ja *D. melanogaster* -lajin PGRP- ja GGBP-ryhmän proteiinit näyttävät olevan vain kaukaista sukua toisilleen (Tanaka et al. 2008). Monille *Diptera*-suvussa tunnistetuille PRR:ille ei ole suoria ortologeja *Lepidoptera*-lajeissa (Tanaka et al. 2008). Jotkin *Lepidoptera*-lahkon PRR:t tunnistavat sellaisia taudinaiheuttajien konservoituneita mikrobirakenteita, joita *D. melanogaster* -kärpäsen

immuunipuolustus ei kykene tunnistamaan, kuten hemoliini (Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013, Kanost et al. 2004). Hemoliini tunnistaa bakteeriaalisia lipopolysakkarideja ja lipoteikkohappoja (Yu & Kanost 2002). Lipoteikkohappo on osa Gram-positiivisten bakteerien soluseinän peptidoglykaanirakennetta (Yu & Kanost 2002). Hemoliinin tuotanto kasvaa huomattavasti infektion aikana *M. sexta* -lajissa (Yu & Kanost 2002, Kanost et al. 2004).

Hyönteisten PGRP-proteiinit sisältävät PGRP-domeenin, joka on homologinen bakteeriaalisen kakkostyyppin amidaasin kanssa, joka ylläpitää bakteerien soluseinän peptidoglykaanirakennetta (Kang et al. 1998). PGRP-proteiinit tunnistavat ja sitovat peptidoglykaania (Kang et al. 1998). PGRP-perheen proteiineja ilmentyy erityisesti hyönteisen rasvakudoksessa ja hemosyyteissä, ja niitä esiintyy sitoutuneena solukalvoon, vapaina hemolymfassa tai solujen sisällä (Dziarski & Gupta 2006). Useiden PGRP-proteiinien ilmentyminen kasvaa kun bakteeriuhka tunnistetaan (Kang et al. 1998). Jotkin PGRP-proteiinit osallistuvat myös Imd-kaskadin estämiseen (Bischoff et al. 2006). *B. mori* -lajissa PGRP-perheeseen kuuluu 12 geeniä, joista kuusi ovat lyhyitä ja kuusi pitkiä (Tanaka et al. 2008). GGBP-perheen proteiineja, jotka sitovat beta-1,3-glukaania (β GRP), on *B. mori* -lajissa ainakin neljä ja niiden ortologeja löytyy *Lepidoptera*-lajeissa, mutta ei *Diptera*-lajeissa (Tanaka et al. 2008). *Heliconius*-lajit ovat vielä näitä lajeja vähemmän tunnettuja ja immuunigeenien tutkimus on alkutekijöissään. Tarkkaa tietoa siitä mitkä PGRP-proteiinit vastaavat toiminnallisesti tunnettuja *Lepidoptera*-proteiineja ei ole. Kaikki tieto perustuu laskennallisiin menetelmiin ja sekvenssien samankaltaisuuteen. Tutkituin *Heliconius*-laji on *Heliconius melpomene*, jonka PGRP-sekvenssejä on annotoitu, mutta niiden tarkka toiminta ei ole selvää.

2.3.1.2. Imd

D. melanogaster -kärpäsessä PGRP-LC ja -LE toimivat solun ulkoisina tunnistajareseptoreina meso-diaminopimeliinihappopitoiselle peptidoglykaanille, jota on erikoisesti Gram-negatiivisten bakteerien soluseinissä (Choe et al. 2005). PGRP-LC on solukalvon läpäisevä reseptori, kun taas PGRP-LE on yleisesti vapaana hemolymfassa (Ferrandon et al. 2007). PGRP-LC on osa immuunipuolustusta useita Gram-negatiivisia

bakteereja vastaan *D. melanogaster* -kärpäsessä ja osallistuu Imd-radan aktivaatioon (Choe et al. 2005). Imd aktivaatio johtaa Relish-transkriptiofaktorin fosforylointiin ja halkaisuun (Hedengren et al. 1999, Ferrandon et al. 2007). Proteiinin halkaisusta vapautuu REL, joka on NF- κ B-transkriptionfaktori. Fosforylointi mahdollistaa transkriptiofaktorin siirtymisen tumaan ja useiden antimikrobiaalisten peptidi geenien aktivoinnin (Ferrandon et al. 2007). Imd-radan negatiiviseen säätelyyn osallistuvat muunmuassa PGRP-SC1 ja -SC2 (Bischoff et al. 2006) ja PGRP-LF (Tavignot et al. 2017). Imd-rata on yliaktiivisena vaarallinen (Bischoff et al. 2006, Tavignot et al. 2017). Imd-rata on huonosti tunnettu *Lepidoptera*-lajeissa, mutta osa radan ortologeja on tunnistettu *M. sexta*- ja *B. mori* -lajeissa (Tanaka et al. 2008). *D. melanogaster* -lajin Imd-radan PRR:lle ei ole suoria ortologeja *B. mori* -lajissa. *B. mori* -lajissa Imd-rata aktivoituu myös lysiinipitoista peptidoglykaania tunnistettaessa. (Tanaka & Yamakawa 2011) Imd-radan solunsisäisiä signaalitransduktiokaskadin osia, jotka on tunnistettu *D. melanogaster* -lajissa, on myös *B. mori* -lajissa (Tanaka et al. 2008). Relish-transkriptiofaktorilla on *B. mori* -lajissa kaksi vaihtoehtoisesti silmukoitua transkriptia (Tanaka et al. 2008).

2.3.1.3. Toll

D. melanogaster -lajissa PGRP-perheen proteiinit PGRP-SA ja -SD tunnistavat Gram-positiivisten bakteerien soluseinän lysiinipitoista peptidoglykaania ja beta-1,3-glukaania (Michel et al. 2001, Dziarski & Gupta 2006). Toll-rata aktivoituu myös sieni-infektiossa (Ferrandon et al. 2007). Kun PGRP-proteiinit tunnistavat gram-positiivisia bakteereja, ne aktivoivat proteaaseja ja proteolyyttisiä kaskadeja, jotka halkaisevat proSpätzle-proteiinin sen aktiiviseen muotoon, Spätzle-sytokiiniin (Michel et al. 2001). Spätzle on Toll-solukalvoreseptoriproteiinin ligandi, joka sitoutuessaan aktivoi Toll-radan (Michel et al. 2001). Kun Spätzle sitoutuu Toll-reseptoriin Toll-radan komponentit muodostavat kompleksin, joka johtaa Cactus-hiljentäjän fosforylointiin. Cactus-hiljentäjän fosforylointi johtaa DIF:n (dorsal-related immunofactorin) vapautumiseen, sekä Dorsal-transkriptiofaktorin fosforylointiin (Ferrandon et al. 2007). DIF ja Dorsal ovat laajatoimintaisia nuclear factor kappa B (NF- κ B)-transkriptiofaktoreita (Ferrandon et al. 2007). Fosforylointi mahdollistaa transkriptiofaktoreiden siirtymisen tumaan. Ne sitoutuvat spesifiseen κ B-promoottoriin kohdegeeneissä, ja johtavat nopeaan muutokseen

kohdegeenien ilmentymistasossa (Ferrandon et al. 2007). Toll- ja Imd-radan aktivaatio johtaa antimikrobiaalisten peptidien tuotannon lisäksi satojen immuuniliitteisten geenien kasvaneeseen ilmentymiseen (Ferrandon et al. 2007).

Lepidoptera-lahkon kaikkia välivaiheita ja vaikuttajaproteiineja ei tunneta. Joitakin *Diptera*-lajeissa tutkittuja Toll-radan aktivaatioon osallistuvia proteiineja ei löydy *Lepidoptera*-lajeista (Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013). *Lepidoptera*-lajeissa Toll-rata aktivoituu usein myös Gram-negatiivisia bakteereja kohdatessa (Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013). Toll-radan solunsisäiset signaalikaskadiproteiinit ovat hyvin konservoituneita koko hyönteiskunnassa (Tanaka et al. 2008). Sen komponenttien, kuten MyD88:n, Pelle:n ja Tube:n ortologit löytyvät *B. mori* -lajista (Tanaka et al. 2008) ja Spätzle *M. sexta* -lajissa (An et al. 2010). Imd- ja Toll-ratojen toiminnallisia proteiineja ei ole tutkittu tarkasti *Heliconius*-lajeissa. Kaikki tieto perustuu ensisijaisesti tutkimuksiin muissa *Lepidoptera*-lajeissa.

2.3.1.4. Antimikrobiaaliset peptidit

Antimikrobiaaliset peptidit (AMP) ovat usein lyhyitä antibioottisia peptidejä, joiden tuotanto kasvaa merkittävästi infektion aikana (Unckless & Lazarro 2016). AMP:ta tuotetaan hyönteisen rasvakerroksessa ja hemosyyteissä (Lavine et al. 2005). AMP:t eritetään hemolymfaan ja ne toimivat tyypillisesti hajoittamalla tai heikentämällä patogeenien soluseinärakenteita (Unckless & Lazarro 2016). κ B-elementti on konservoitunut antimikrobiaalisten peptidien 5' promoottorialueella *B. mori* -lajissa (Tanaka & Yamakawa 2011). NF- κ B-tyypin transkriptiofaktorien DNA:ta tunnistava domeeni on rakenteeltaan konservoitunut, mutta proteiinien inhibitiotekijöitä sitovat alueet eivät ole (Tanaka & Yamakawa 2011). Tämä johtaa eroihin transkriptiofaktorien regulaatiossa lajien välillä (Tanaka & Yamakawa 2011).

AMP:iden geenit ovat tyypillisesti osana useiden geenien muodostamia suuria geeniperheitä (Unckless & Lazarro 2016). Hyönteisten AMP-geeneissä esiintyy tavallista enemmän duplikaatio- ja deleetiotapahtumia, ja ne ovat tasapainoittavan valinnan alaisia (Unckless & Lazarro 2016). *B. mori* tuottaa ainakin kuutta antimikrobiaalista

peptidiperhettä: cecropiinia, attasiinia, leboosiinia, morisiinia, gloveriinia, defensiiniä, sekä lysotsyymejä (Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013). *M. sexta* -lajissa on tunnistettu 86 erillistä AMP-geeniä, jotka tuottavat defensiiniä, gallerimysiiniä, gloveriinia, leboosiinia, diapausiinia, attasiinia ja lysotsyymien sukuisia AMP-proteiineja (He et al. 2015).

Hyönteislajien AMP:t jaotellaan kolmeen rakenteelliseen kategoriaan: 1) alfa-helikaaliset peptidit, kuten cecropiini, 2) kysteiinipitoiset rikkisiltoja muodostavat proteiinit, kuten gloveriinit, 3) glysiini ja proliinirikkaat proteiinit, kuten attasiini (He et al. 2015). *B. mori* -lajin gloveriinilla on neljä isoformia (Tanaka & Yamakawa 2011). Gloveriini toimii erityisesti Gram-negatiivisia mikrobeita kohtaan (Tanaka & Yamakawa 2011). *M. sexta* -lajissa attasiini-geenejä on tunnistettu 11 (Tanaka & Yamakawa 2011). Attasiini inhiboi useiden bakteerin solukalvon proteiinien tuotantoa, johtaen solukalvon läpäisevyyden kasvuun (He et al. 2015). Attasiini toimii erityisesti Gram-negatiivisia mikrobeita kohtaan (Tzou et al. 2002). Gloveriini aktivoituu Gram-negatiivisia ja -positiivisia bakteereita ja sieniä vastaan (Xu et al. 2012). Geenien kopionumerot ja samankaltaisuus viittaavat kopiotahtumiin geeni- ja eksonitasolla (He et al. 2015). Usean erirakenteisen AMP-geenin samanaikainen aktivoituminen voi tarjota laajemman suojan patogeenejä vastaan (He et al. 2015, Bolouri et al. 2016, Tzou et al. 2002).

B. mori -lajissa antimikrobiaalisten peptidien tuotanto on korkeinta rasvakudoksessa ja hemosyyteissä (Tanaka & Yamakawa 2011). Eri kudosten välillä on eroa geenien ilmentymistasossa (Tanaka & Yamakawa 2011). Infektion aikana antimikrobiaalisten peptidien tuotanto on suurinta rasvakudoksessa, hemosyyteissä ja epiteelisoluissa *M. sexta* -lajissa (He et al. 2015). Useiden humoraalisen puolustuksen PRR:ien ja antimikrobiaalisten peptidien tuotanto on perustilassa matalaa ja se kasvaa huomattavasti infektion aikana (Kanost et al. 2004, Lavine et al. 2005). Kun AMP-geenit aktivoidaan niiden ilmentyminen kasvaa voimakkaasti kahdessa tunnissa ja ilmentyminen pysyy korkeana yli 24 tuntia (Lavine et al. 2005). *Heliconius*-lajien AMP-geenejä ei ole kokeellisesti tutkittu.

2.3.2. Soluvälitteinen immuunipuolustus

2.3.2.1. Yleistä

Antimikrobiaalisten peptidien täysmittainen tuotanto ja laajemman immuunivasteen käynnistyminen Toll-, Imd-, tai JAK/STAT-radan aktivoinnista voi kestää useita tunteja (Dubovskiy et al. 2016). Soluvälitteiset vasteet taas ovat verrattain todella nopeita. Soluvälitteisen immunitetin komponentteja ovat erityisesti hyönteisen yksittäisten hemosyyttien suorittama pienten vierasmikrobien fagosytoosi, nodulaatio jossa immuunisolut piirittävät useita patogeeneja ja suurempien vierasesineiden tai parasiittien enkapsulaatio. Soluvälitteisen immunitetin aktivointi perustuu suurin osin humoraalisen puolustuksen tunnistusreseptoriproteiinien ja hemosyyttien kalvorseptorien yhteistoimintaan. PRR:t aktivoivat hemosyyttejä tunnistaessaan patogeeneja, ja ovat osallisia fagosytoosin ja enkapsulaation käynnistyksessä (Lavine & Strand 2002). Humoraalisen puolustuksen proteiinit, kuten hemoliini, joissakin tilanteissa myös inhiboivat hemosyyttien aggregaatiota infektiopaikalle (Kanost et al. 2004).

Hyönteisten hemolymfassa yleisimpiä hemosyyttejä ovat granulositytit, oenosytoidit, plasmatosyytit ja pro-hemosyytit. *Lepidoptera*-lahkossa hemolymfan yleisimmät hemosyytit ovat granulositytit ja plasmatosyytit, jotka kykenevät kiinnittymään vierasaineisiin ja ovat merkittävin osa fagosytoosikoneistoa (Strand 2008). Enkapsulaatio ja nodulaatio perustuvat granulo- ja plasmatosyyttien kasvaneeseen adheesioon vierastekijöiden ympärille, mikä johtaa vierastekijöiden eristykseen hemolymfasta. Enkapsulaatioon ja nodulaatioon osallistuu myös melaniini, sklerotiini ja usea muu proteiini (Dubovskiy et al. 2016). Oenosytoidit syntetisoivat fenoloksidaasin (phenoloxidase, PO) esiastetta profenoloksidaasia (proPO) (Kanost et al. 2004). ProPO on PO:n entsyymiprekursori, joka aktivoidaan infektion aikana. ProPO:ta vapautuu hemolymfaan suurissa määrin kun oenosytoideja hajoitetaan osana immuunivastetta (Dubovskiy et al. 2016). PO-kaskadin aktivaatio johtaa hemosyyttien adheesioon, haavan tai vierastekijän enkapsulaatioon ja melaniinin tuotantoon (Strand 2008). Kun kapsuli on muodostunut vierastekijä usein kuolee (Dubovskiy et al. 2016). ProPO muodostuu kahdesta alayksiköstä, joiden geenit *B. mori* -lajissa ovat BmPPO1 ja BmPPO2 (Tanaka et

al. 2008). ProPO:n rakenne on hyvin samankaltainen kaikissa hyönteislajeissa ja se esiintyy hyönteiskunnassa laajasti (Tanaka et al. 2008).

2.3.2.2. Enkapsulaatio

Enkapsulaatio on suoja sekä bioottisia, että abioottisia uhkia vastaan. *Lepidoptera*-lahkossa useat hemosyytit sitoutuvat vierastekijään, kuten parasiitin tai sukkulamadon pintaan, ja eristävät sen hemokeelistä (Dubovskiy et al. 2016). Enkapsulaatio käynnistyy nopeasti kun vierastekijä tunnistetaan hemolymfassa, ja kapsulin rakentuminen jatkuu useita tunteja (Ratcliffe & Gagen 1977). Enkapsulaation lopputuloksena on useita kerroksia kuolleita melanisoituneita hemosyyttejä (Dubovskiy et al. 2016). Monessa hyönteislajissa kapsulia rakennetaan 2 – 24 tunnin ajan, ja se voi olla valmis vasta kolmen päivän päästä (Ratcliffe & Gagen 1977). Sekä humoraaliset, että soluvälitteiset tekijät osallistuvat kapsulaatiokohteen tunnistukseen. Kun kohde on tunnistettu, plasmato- ja granulosyytit kerääntyvät paikalle ja granulosyyttejä ja oenosytoideja hajoitetaan (degranulaatio) ja niistä vapautuu immuunivasteen tekijöitä kuten proPO:a (Dubovskiy et al. 2016). Degranulaatio johtaa myös typpi- ja happiradikaalien tuotantoon (Dubovskiy et al. 2016). *B. mori* -lajissa typpioksidei nostaa antimikrobiaalisten peptidien ilmentymistasoa (Tanaka & Yamakawa 2011). Granulosyyttien tai PRR:n sitoutuminen vierastekijään muuttaa plasmatosyyttien pintarakenteen voimakkaasti sitoutuvaksi, mikä johtaa plasmatosyyttien aggregaatioon vierastekijän ympärille (Dubovskiy et al. 2016). Tämän rakennemuutoksen käynnistävät erilaiset plasmatosyyttiaktivaattorit, sitoutuessaan plasmatosyyttien spesifisiin pintareseptoreihin (Dubovskiy et al. 2016). *B. mori* -lajissa melaniinia tuotetaan usean seriiniproteaasin toimesta proPO-kaskadissa, mutta kaikkia komponentteja ja välivaiheita ei tunneta. proPO-kaskadin proteiinit eivät ole konservoituneita *M. sexta*- ja *B. mori* -lajien välillä (Tanaka & Yamakawa 2011).

Melaniini on tumma pigmentti, joka muodostuu fenoloksidaasin (PO:n) syntetisoimana. PO-entsyymi on happireduktaasi, joka hapettaa fenoleita ja tuottaa kinoneita, jotka polymerisoituvat melaniiniksi ja muodostavat osan kapsulin rakennetta (Dubovskiy et al. 2016). Melanisaatio tapahtuu nodulaation ja enkapsulaation aikana, ja myös kun hyönteinen haavoittuu. Melanisaatio käynnistyy kun PRR:t tunnistavat infektion ja

aktivoivat proPO:ta-aktivoivat proteinaasit (PAP:t), jotka ovat normaalisti inaktiivisessa muodossa hemolymfassa (Jiang et al. 1998, Jiang et al. 2003). PO:n inaktiivista muotoa, proPO:ta, on jossain määrin vapaana veressä, ja sitä tuottavat myös epiteelisolut, mutta immuunivasteessa sitä vapauttavat erityisesti oenosytoidit (Dubovskiy et al. 2016). Immuunivasteen osana oenysytoideja tuhotaan ja proPO:ta vapautuu infektiopaikalla hemolymfaan. PAP:ien aktivaatio tapahtuu muutamassa minuutissa mikrobien tunnistuksesta (Jiang et al. 1998, Jiang et al. 2003). Aktivoidut PAP:t muuttavat proPO:n sen aktiiviseen muotoon PO:ksi, joka käynnistää melaniinin tuotannon melanogeneesissä (Dubovskiy et al. 2016). PO:n entsymaattisessa toiminnassa vapautuu happiradikaaleja ja kinonit itsessään ovat todennäköisesti myrkyllisiä mikro-organismeille (Dubovskiy et al. 2016). Enkapsulaatio on fysiologisesti vaativaa ja sen nopeus riippuu ympäristökijöistä, kuten ruuan saatavuudesta (Prokkola et al. 2014). Melanisaation nopeuden uskotaan korreloivan laajemmin immunitetin vahvuuden kanssa (Prokkola et al. 2014).

2.4. Menetelmien tausta

2.4.1. Enkapsulaatiokoe

Enkapsulaatiokoetta on aiemmassa kirjallisuudessa käytetty yhtenä immuunipuolustuksen mittarina (Baer et al. 2006, Saastamoinen & Rantala 2013, Prokkola et al. 2013).

Enkapsulaatiokokeessa perhosen keskiruumiiseen työnnetään muovifilamentti, joka käynnistää perhosen enkapsulaatioreaktion. Muovifilamentin annetaan olla paikallaan tunti, minkä jälkeen filamentin ympärille muodostuneen enkapsulaatiokerroksen tummuutta mitataan kuva-analyysillä. Enkapsulaatioarvo on harmaa-arvo, joka kuvastaa enkapsulaatiokerroksen tummuutta muovifilamentin ympärillä ja melanisoituneen kerroksen paksuutta. Muovifilamentin ympärille muodostuvan melanisoituneiden hemosyyttien kerroksen paksuuden uskotaan olevan verrannollinen perhosen immunitetin vahvuuteen parasiitteja ja sienipatogeeneja kohtaan (Prokkola et al. 2013). Aiemmissa kokeissa tunti on ollut riittävän pitkä aika melaniinin muodostumiseen muovifilamentin ympärille, mutta riittävän lyhyt jotta perhosten väliset yksilöerot enkapsulaationopeudessa erottuvat (Saastamoinen & Rantala 2013).

2.4.2. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR)

PCR, eli polymeerasiketjureatkio, on DNA-polymeerasia ja alukkeita hyväksikäyttävä DNA:n monistamismenetelmä, johon kuuluu kolme päävaihetta: 1) DNA:n denaturaatio, 2) alukkeiden komplementaarinen pariutuminen kohde-DNA:n kanssa ja 3) DNA:n monistaminen, joita toistetaan useita kertoja (30-40x) monistamaan kohde-DNA:ta. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR tai RT-qPCR) on PCR:n sovellus, jossa monistamista seurataan reaaliaikaisesti merkkiaineilla. Täydellinen PCR-reaktio kaksinkertaistaa templaatin joka syklissä, eli monistaa templaattia eksponentiaalisesti. qPCR-reaktion eksponentiaalisen vaiheen jälkeen monistus asteittain hidastuu, johtuen PCR-reaktion estäjistä ja reaktioon vaadittavien aineosien hupenemisesta (Arya et al. 2005). Täydellisen PCR-reaktion estäjiä ovat mm. polymeerasin toimintaa estävät reaktioputkeen kertyvät pyrofosfataasit, templaattien tai alukkeiden keskinäinen pariutuminen, ja epäpuhtaudet reaktionesteissä (Arya et al. 2005). qPCR-reaktion eksponentiaalisesta vaiheesta voidaan päätellä kuinka paljon kohde-DNA:ta on alkuperäisessä näytteessä (Arya et al. 2005).

Menetelmässä käytetään mRNA:sta käännettyä cDNA:ta, jota monistetaan DNA-polymeerasilla PCR-reaktiossa, mutta muutoksia seurataan reaaliaikaisesti fluoresoivien koettimien tai fluoresoivan merkkiaineen emittoiman fluoresenssisignaalin avulla. Reaktion kulkua seuraava tietokone tunnistaa monistamisesta syntyvän fluoresenssin. Cycle threshold -arvo (Ct-arvo) on se PCR-syklien määrä, jolla fluoresenssisignaali ylittää laskennallisen merkittävän kynnysarvon (Arya et al. 2005). Ct-arvo on siis kääntäen verrannollinen cDNA:n määrälle näytteessä. Hyvin matala Ct-arvo, eli aikaisin ylittynyt kynnysarvo, kertoo todella suuresta määrästä kyseistä cDNA:ta. qPCR on usein käytetty työkalu immunologisessa tutkimuksessa.

qPCR:ää on käytetty immuunigeenien ilmentymistason selvittämiseen useassa lajissa. qPCR:ää käytetään kun seurattavia geenejä on alle 100 (Fassbinder-Orth 2014). qPCR-menetelmän etu on reagenssien suhteellisen matala hinta, sekä laitteiden ja analyysimetodien helppo saatavuus (Fassbinder-Orth 2014). qPCR-menetelmä vaatii vähemmän genomista tietoa kuin RNA-sekvensointi tai mikrosirut. Myös hyvinkin lyhyille

sekvensseille voi suunnitella toimivat alukkeet (Fassbinder-Orth 2014). qPCR-menetelmän heikkous on, että tutkittavien geenien määrä on aina pieni. Tutkittavien immuunigeenien valinta on haastavaa vähän tutkituissa lajeissa, koska joidenkin immuunigeenien toiminta on epäselvää ja yksittäisten geenien toiminta ei usein riitä selittämään laajempia ilmiöitä (Fassbinder-Orth 2014).

2.4.2.1. SYBR Green I

SYBR Green I -fluoresoiva väriaine sitoutuu epäspesifisesti kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, ja sitoutuessaan emittoi voimakasta fluoresoivaa signaalia (Arya et al. 2005). SYBR Green qPCR-reaktiossa fluoresoivan signaalin määrä seurataan monistusvaiheen lopussa (Arya et al. 2005). Fluoresenssin määrä on verrannollinen kaksijuosteisen DNA:n määrään. Koska SYBR Green -reaktio ei ole spesifinen, ja kaikki kaksijuosteinen DNA näytteessä tuottaa fluoresoivaa signaalia, reaktion tarkkuutta häiritsevät huomattavasti alukkeiden muodostamat dimeerit tai alukkeet, jotka virheellisesti monistavat väärää templaattia (Arya et al. 2005). SYBR Green qPCR-laadunvalvontaan kuuluu sulamiskäyrien (engl. Melting Curve) seuranta. Sulamiskäyrä ajetaan qPCR-reaktion viimeisenä osana. Sulamiskäyräajossa nostetaan asteittain lämpötilaa lähes kiehumispisteeseen asti samalla seuraten fluoresenssisignaalia. Sulamiskäyrät kuvaavat fluoresenssia lämmön funktiona, ja käyrän muodosta ja huipusta voidaan päätellä PCR-tuotteiden irtoamislämpötilat (T_m) ja onko reaktiossa merkittävä määrä kohdesekvenssistä poikkeavia fluoresenssin lähteitä (Arya et al. 2005).

2.4.2.2. MIQE

Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) ohjesäännöt määrittävät raamit hyvälle RT-qPCR (qPCR) tutkimukselle (Bustin et al 2009). MIQE-ohjesäännöt antavat ohjeistusta qPCR työn kaikkiin vaiheisiin ja niiden päämääränä on varmistaa työn luotettavuus ja toistettavuus. Tutkielmassa pyritään täyttämään MIQE:n toistettavuusstandardit ja seuraamaan MIQE-standardien antamia suosituksia.

MIQE standardien mukaan hyvälaatuinen qPCR-työ vaatii kahdesta kolmeen hyvää vertailugeeniä (myös “kontrolligeeni”, “referenssigeeni” tai “housekeeping”-geeni) näytteiden normalisointiin. Hyvät kontrolligeenit ilmentyvät tutkittavissa olosuhteissa tasaisesti, ajasta, paikasta tai yksilöstä riippumatta. Normalisoinnissa suhteutetaan kohdegeenien mitattu ilmentyminen valittujen vertailugeenien mitattuun ilmentymiseen näytteittäin. Normalisoinnilla korjataan näytteiden välisten erojen, kuten pitoisuuksien, yksittäisten näytteiden amplifikaation tehokkuuden tai muiden virhelähteiden vaikutusta tutkimuksen tuloksiin (Bustin et al 2009). Normalisointiin käytettyjen geenien vakaus tutkittavien olosuhteiden välillä tulee osoittaa kokeellisesti (Bustin et al 2009). Kontrolligeenien laatu vaikuttaa voimakkaasti lopputulokseen (Bustin et al. 2009, Fassbinder-Orth 2014).

2.4.3. Biotietokannat ja laskennalliset työkalut

Biotietokannat sisältävät suuren määrän biologista sekvenssi-, rakenne- ja toiminnallisuustietoa haettavassa muodossa, sekä haku- ja vertailutyökaluja. Biotietokannat tyypillisesti erikoistuvat esimerkiksi nukleotidi- tai proteiinitietokannoiksi, tai lajispesifisiksi tietokannoiksi. Hyönteis- ja erityisesti perhostutkimusta varten on perustettu kaksi ENSEMBL-tietokantaa: Lepbase ja Ensebl-Metazoa. Lepbase on *Lepidoptera*-lahkoon erikoistuva genomitietokanta, joka kokoaa useiden eri tutkimusryhmien tuottamaa sekvenssintietoa, ja jäsentää sitä haettavaan muotoon (Challis et al. 2016). Ensembl-Metazoa on genomitietokanta, joka erikoistuu hyönteisiin ja muihin selkärangattomiin (Kersey et al. 2018).

ENSEMBL LepBase sisältää haettavassa muodossa useiden *Lepidoptera*-lajien genomien kasaukset (genome assembly), ja kahden *H. erato* alalajin genomiset kokoonpanot “*Heliconius erato demopoon v1*” ja “*Heliconius erato lattivita v1*”. Genomiltaan tunnetuin ja varmimmin annotoiduin *Heliconius*-lajin *H. melpomenen* sekvenssintietoa löytyy myös ENSEMBL Metazoasta. Molemmat tietokannat sisältävät BLAST-haku mahdollisuuden, jota käytetään, kun suunnitellaan spesifisiä alukkeita PCR-reaktioihin.

Alukesuunnittelussa käytetään yleisesti myös erilaisia selaintyökaluja, esimerkkeinä IDT PrimerQuest- ja UNAFold -työkalut. PrimerQuest-työkalu on selaintyökalu, joka käyttää Primer3-algoritmia alukkeiden suunnittelussa (IDT PrimerQuest 2012, Untergasser et al. 2012). IDT UNAFold -selaintyökalulla voidaan määritellä alukkeiden laskennallisia sulamispisteitä, mahdollisia paritumisia ja hiuspinnirakenteita (IDT UNAFold). IDT UNAFold on selaintyökalu, joka perustuu UNAFold Unix-työkalulle (Markham & Zuker 2008). Alukkeiden ja amplikonin välisiä sekundaarirakenteita voidaan tutkia mm. ThermoFisher Scientific Multiple Primer Analyzer -selaintyökalulla (Multiple Primer Analyzer). Lähisukulaisten sekvenssejä pystytään tarkastelemaan EMBL-EBI Clustal Omega-selaintyökalulla, joka perustuu Clustal-linjaustyökaluun (EMBL-EBI Clustal Omega, Larkin et al. 2007).

2.4.4. qPCR-töissä käytettävät laskennalliset työkalut

qPCR-kirjallisuudessa käytetään useita laskennallisia työkaluja muodostamaan vakaita qPCR vertailugeenipareja. Usein käytettyjä työkaluja ovat mm. GeNorm, NormFinder ja BestKeeper (De Spiegelaere et al. 2015, Piron Prunier et al. 2016). RefFinder on selaintyökalu, joka yhdistää yllä mainitut kolme algoritmia ja tuottaa kaikkien kolmen perusteella lasketun yhteissuosituksen.

2.4.4.1. GeNorm

GeNorm-algoritmia käytetään mm. SLqPCR R-paketilla dokumentaation mukaisesti (Kohl 2007, Kohl 2018). SLqPCR-paketin GeNorm-algoritmi perustuu Vandesompele et al. 2002 julkaisuun. GeNorm metodi laskee suhteellisia vakausarvoja vertailugeeneille pareittain. GeNorm metodissa ryhmitetyille Ct-arvoille suoritetaan geometrinen keskiarvoittaminen ennen GeNorm algoritmin käyttöä. GeNorm-algoritmi laskee ensin geenien vakauden ensimmäisessä tutkittavassa olosuhteessa, ja sitten toisessa, ja sitten muodostaa sellaiset parit jotka olisivat vakaita molemmissa olosuhteissa (Vandesompele et al. 2002). GeNorm-algoritmi tuottaa vakausarvon (M-arvo), joka kuvaa geeniparin laskennallista vakautta eri olosuhteissa. Pieni vakausarvo on vakaampi, suositeltu raja-arvo hyvälle parille on 0,15 (Vandesompele et al. 2002, Kohl 2018).

2.4.4.2. NormFinder

NormFinder työkalu perustuu Andersen et al. 2002 julkaisuun, ja sitä käytetään sen virallisella R-paketilla dokumentaation mukaisesti (NormFinder 2015). NormFinder algoritmi määrittää ryhmien välistä variaatiota, jonka se olettaa geenin vakaudeksi eri olosuhteissa (Andersen et al. 2002). NormFinder-algoritmi laskee geenien variaatiota sekä ryhmän sisällä, että ryhmien välillä (Andersen et al. 2002). NormFinderissä Ct-arvot voidaan syöttää raakana Ct-arvona tai 2^{-Ct} -muodossa, molemmat tavat tuottavat saman tuloksen. Ct-arvojen lisäksi annetaan tieto ryhmästä. Myös NormFinder tuottaa lopputuloksena suosituksena geeniparin, jolle se laskee vakausarvon. Pienempi vakausarvo on vakaampi, suositeltu raja-arvo hyvälle parille on 0,25 (NormFinder 2015).

2.4.4.3. RefFinder

Aiempaan tutkimustyöhön perustuvaa RefFinder-työkalua ylläpidetään selaintyökaluna (RefFinder 2012, Xie et al. 2012). RefFinder yhdistää neljä laajasti käytettyä vertailugeenien vakautta arvioivaa algoritmia yhteen työkaluun. RefFinder näyttää tulokset BestKeeper, NormFinder, Genorm ja vertailevan delta-Ct metodin algoritmeista. RefFinder työkaluun syötetään Ct-arvot sellaisenaan, ilman ryhmätietoa tai Ct-arvojen käsittelyä. Tämä poikkeaa sekä NormFinderin että GeNormin tiedonsyötöstä, joissa ryhmätieto on analyysin kannalta oleellista.

3. Tavoitteet

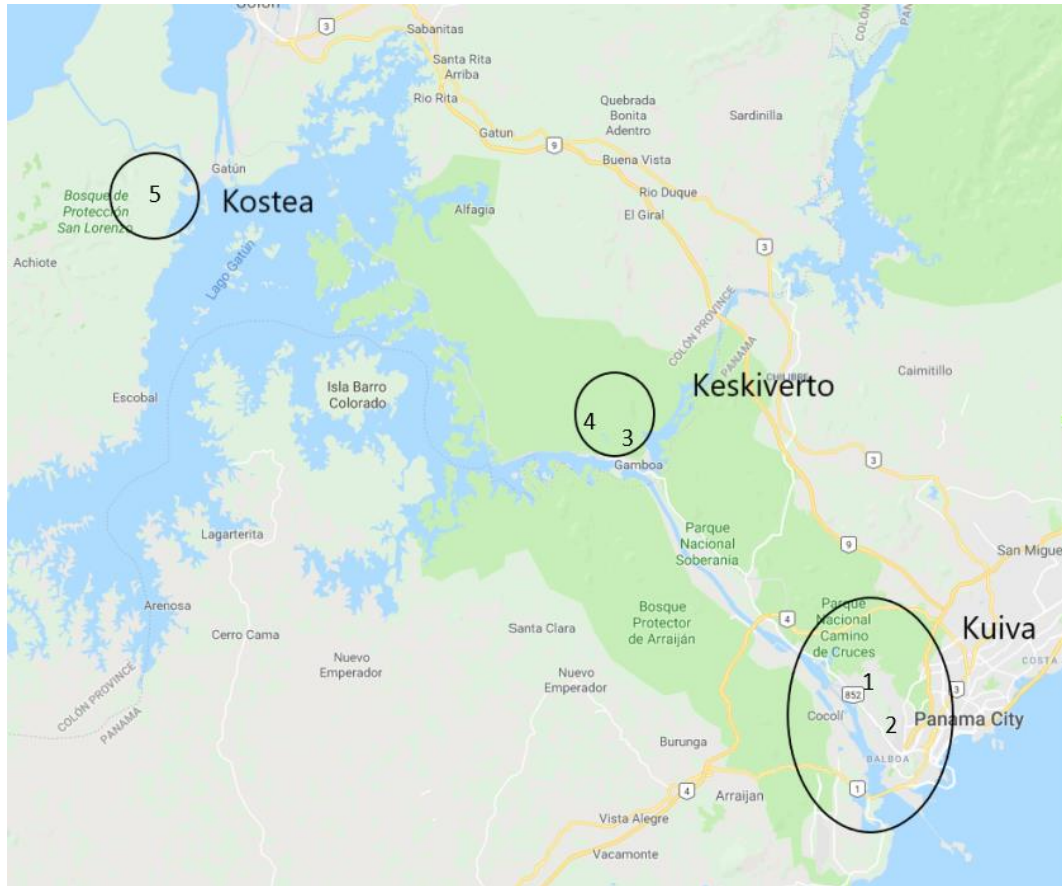
Vaikka *Heliconius*-perhoset ovat paljon tutkittu evoluutiobiologian malli, niiden elinkierto-evoluutiosta tiedetään varsin vähän. Immunitetti on yksi elämänhistorijan tekijä, joka vaikuttaa selviytymiskykyyn ja näin myös lisääntymismenestykseen. Useat ympäristötekijät vaikuttavat ympäristön patogeenien määrään ja laatuun, ja näin myös määrittävät raamit immunitetille. Maaperän ja ympäristön kosteus on muilla hyönteislajeilla yhdistetty elämänhistorian tapahtumiin ja immuuniuhkan laatuun ja suuruuteen. Tutkimuksen tavoitteena on selvittää vaihteleeiko perhosten immuunigeenien ilmentyminen ympäristön eri kosteusolosuhteissa. Perhosten immuunigeenien ilmentymistä mitataan kahdella menetelmällä: enkapsulaatiokokeella ja qPCR:llä vertailemalla neljän

immuunigeenin ilmentymistasoa eri kosteusolosuhteissa. Tavoitteena on selvittää 1) vaihteleeeko enkapsulaation määrä eri kosteusolosuhteissa, 2) vaihteleeeko immuunigeenien ilmentyminen eri kosteusolosuhteissa ja 3) onko enkapsulaatioreaktion voimakkuuden ja immuunigeenien ilmentymisen välillä korrelaatiota.

4. Aineisto ja menetelmät

4.1. Työssä käytettävät perhoset

Tutkimuslajia ovat *Heliconius erato* -perhoset. *Heliconius erato* on laajasti Keski- ja Etelä-Amerikkaan levinnyt laji, joka jakaa siipikuvionsa muun muassa *Heliconius melpomenen* ja *Heliconius timaretan* kanssa (Merrill et al. 2015, Arias et al. 2016). *H. erato* elää trooppisten sademetsien läheisyydessä, keskittyen sademetsien reunamille (Turner 1971). *H. erato* perhosnäytteet pyydystettiin keskipäivällä luonnosta Smithsonian Tropical Research Instituten tutkimusaseman läheisestä viidakosta Panamasta (Kuva 2). Perhoset pyydystettiin kolmijakoisella kosteusgradientilla, kosteista, keskiverroista ja kuivista olosuhteista (Taulukko 1). Pyydystys tapahtui kuutena eri päivänä toukokuussa 2017 (4.5, 8.5, 9.5, 10.5, 11.5) ja sen teki Anniina Mattila. Toukokuu on kostean kauden ensimmäinen kuu. Kosteusolosuhteet alueella perustuvat Smithsonian Tropical Research Instituutin pitkän aikavälin tietoihin alueelta ja taulukoidut arvot kuvaavat Toukokuun arvoja (Taulukko 1). Kostean alueen keskimääräinen vuotuinen sademäärä on 3300 mm, keskiverron 2600 mm ja kuivan 1850 mm (BioGeoDB Smithsonian Tropical Research Institute 2018).



Kuva 2. Perhosten pyydystysalueet maantieteellisesti. Kuivia alueita ovat 1) Corozal ja 2) Los Rios, Keskivertoja 3) Gamboa ja 4) Pipeline off ja kostea alue on 5) Canopy Cane Road. Kuva maps.google.com.

Taulukko 1. Keräysalueiden kosteusolosuhteet toukokuussa 2017. Perhostet pyydystettiin viideltä eri alueelta. Alueiden maaperän kosteutta mitattiin tensiometrillä useasta pisteestä usean päivän aikana toukokuussa.

Alue	Kosteusgradientti	Maaperän kosteus (ka)	Perhosnäytteet
Corozal	Kuiva	17%	5
Los Rios	Kuiva	12%	9
Gamboa	Keskiverto	24%	10
Pipeline off	Keskiverto	-	19
Canopy Cane Road	Kosteja	27%	19

Näytteet ovat useista eri alueista, mutta ne ovat muutamien kilometrien suuruisen alan sisältä (Kuva 2). Alueet ovat noin 30 km:n päässä toisistaan (Kuva 2). Yhteensä näytteitä

on 62. Koiraita on näytteistä 48 ja naaraita 15. Kosteiden olosuhteiden näytteitä on 19, kuivia 15 ja keskivertoja 28.

4.2. Perhosten käsittely

Iltapäivällä keräyksen jälkeen perhosille tehtiin enkapsulaatiokoe, jossa muovifilamentti oli paikallaan tunnin. Heti filamentin poiston jälkeen perhonen punnittiin ja preparoitiin näytteeksi. Filamentti säilöttiin kuivana Eppendorf-putkessa -20 °C pakkasessa. Näyte leikattiin symmetrisesti vertikaalisesti ja käsiteltiin RNA-näytteeksi 0,5 ml RNALater-liuokseen ja toinen puoli säilöttiin metanoliin toksisuusanalyysiä varten. Toksisuusanalyysi ei sisälly tähän pro gradu -tutkimukseen. Näytteet säilöttiin jääkaappilämpötilassa (4 °C) RNA-eristykseen asti.

4.3. RNA-eristys ja laadunarviointi

4.3.1. Näytteiden preparaatio eristykseen

Näytteet olivat *H. erato* -perhosen keskiruumiita (thorax), jotka oli säilötty RNALater-liuokseen. Näyte nostettiin RNALaterista ja puolitettiin varovasti pitkittäin. RNA-eristykseen käytettävä puolikas kuivattiin paperilla ja asetettiin 2 ml:n Eppendorf-putkiin, joissa oli 500 µl TRIsurea (BIO-38033, Bioline). Putket jäädytettiin joko nestemäisellä typellä tai asettamalla -86 °C pakastimeen 30-60 minuutiksi, kunnes TRIsure oli täysin jäätynyt.

4.3.2. Näytteiden homogenisaatio

Jäädytettyihin näytteisiin lisättiin ruostumatonta terästä oleva kuula (Qiagen Stainless Steel Beads 5mm, Cat. No. 69989). Näytteet homogenisoitiin TissueLyzer II -laitteella (QIAGEN) frekvenssillä 21-22 Hz kolme kertaa puolitoista minuuttia ja lyhyemmissä puolen minuutin sykleissä kunnes kudokset olivat tarpeeksi hajonneita.

Näytteissä oli homogenisaatiosta huolimatta suuri määrä mustaa sakkaa, joka oli todennäköisesti hyönteisen kitiinipitoista ulkokuorta. Näytteet käytettiin sentrifuugissa

muutaman sekuntin ajan asettamaan sakka pohjalle ja putkiin lisättiin 500 µl Trisure-nestettä. Näytteiden annettiin inkuboitua huoneenlämmössä viisi minuuttia. Inkubaation jälkeen näytteet sentrifugoitiin jäähdytetyssä (4°C) sentrifuugissa, 14000 rpm:ssä 10 minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen putkien neste siirrettiin ilman mustaa sakkaa tai teräskuulaa uusiin 2 ml:n Eppendorf-putkiin.

4.3.3. RNA-eristys

Uusiin putkiin lisättiin 200 µl kloroformia ja putkia ravistettiin noin 15 sekuntia. Näytteiden annettiin inkuboitua huoneenlämmössä kolme minuuttia, minkä jälkeen niitä sentrifugoitiin 14000 rpm:ssä 15 minuuttia. RNA, proteiinit ja DNA erottautuvat tässä vaiheessa eri faaseihin. Ylin faasi eli läpinäkyvä supernatantti johon RNA on kerääntynyt siirrettiin uuteen putkeen koskematta vaaleaan interfaasiin (DNA) tai alimpaan vihertävään faasiin (Trisure, Proteiini). Putkiin lisättiin 500 µl kylmää (-20 °C) isopropanolia (2-propanolia) ja 1 µl glykokeeniä, minkä jälkeen putkia ravistettiin ja näytteiden annettiin inkuboida 10 min huoneenlämmössä. Glykokeeniä lisättiin, jotta seuraavissa vaiheissa muodostuisi näkyvämpi pelletti. Näytteitä sentrifugoitiin 14000 rpm:ssä 10 minuuttia. Putkien pohjalle muodostui vaalea, välillä hyvin vaikeasti nähtävä pelletti. Supernatantti poistettiin hyvin varovaisesti koskematta pellettiin.

4.3.4. Etanolipesut

Seuraavaksi jokaiseen putkeen lisättiin 1 ml 75%:sta etanolia ja näytteitä sentrifugoitiin 14000 rpm 10 minuuttia. Pesu tehtiin kahdesti. Ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen 1 ml etanolia poistettiin putkesta varovaisesti ja korvattiin uudella. Lopuksi etanoli poistettiin varovaisesti koskematta pellettiin ja lopun etanolin annettiin haihtua noin 30 minuuttia. Saostettu RNA liuotettiin takaisin 25-40 µl:aan DEPC-veteen riippuen pelletin koosta.

4.3.5. Laadunarviointi

Näytteiden RNA-pitoisuus mitattiin Nanodrop 3000 -laitteella (Thermo Fisher Scientific) DEPC-vedessä. 12 näytteen RNA eheys arvioitiin Agilent Bioanalyzer 2000 -laitteella (Agilent Genomics).

4.4. cDNA-synteesi ja laadunarviointi

4.4.1. DNAasi käsittely

Ennen cDNA-synteesiä RNA:sta poistettiin mahdollinen kontaminoiva DNA. RNA:ta otettiin DNAasi käsittelyyn 1 µg. Joka putkeen lisättiin 2 µl 4x DNase reaktiopuskuria ja 2 µl DNAasia (Thermo Fisher Scientific DNAase I, RNAase Free-kit, EN0525).. Näytteitä inkuboitin 30 minuuttia 37 °C asteisessa PCR-laitteessa. Inkuboinnin jälkeen jokaiseen putkeen lisättiin 2 µl EDTA:aa, ja näytteitä inkuboitin uudelleen 10 minuuttia 65 °C asteisessa PCR-laitteessa.

4.4.2. cDNA-synteesi

cDNA-synteesi tehtiin iScript cDNA Synthesis kitillä (#1708891, Biorad) protokollan mukaisesti. DNAaasi käsittelyn jälkeiset näytteet puolitettiin cDNA ja RT-kontrolliputkiin. RT-kontrolliputkissa käänteistranskriptaasi jätetään pois, jotta genomisen DNA:n määrä voidaan todeta. cDNA-näytteille ja RT-kontrollinäytteille valmistettiin ensin mastermix eri putkiin, josta sekoitus pipetoitiin jokaiseen näyteputkeen (Taulukko 2).

Taulukko 2. iScript-protokollan mukaiset pitoisuudet reagensseille.

Liuos	cDNA-näyte (µl)	RT-kontrolli-näyte (µl)
5x iScript -reaktiosekoitus	4	4
iScript käänteistranskriptaasi	1	-
DEPC-H ₂ O	5	6

Näytteet ajettiin iScript PCR -ohjelmalla: 1) Esitila: 5 minuuttia 25 °C, 2)

Käänteistranskriptio: 20 minuuttia 46°C ja 3) RT-inaktivaatio: 1 minuutti 95 °C.

Näytteet laimennettiin iScript-protokollan mukaisesti 1:10-suhteessa niin, että lopuksi muodostui 200 µl cDNA:ta ja 200 µl RT-käänteiskontrollia.

4.5. Keskeisten geenien valinta ja alukkeiden suunnittelu

4.5.1. Vertailugeenit

MIQE standardien mukaan hyvälaatuinen qPCR-työ vaatii kahdesta kolmeen hyvää vertailugeeniä. Vertailugeenien ilmentymisen tulisi olla tasaista kaikissa näytteissä olosuhteista ja käsittelyistä huolimatta. Aikuisilla *Heliconius*-perhosilla ei ole useita julkaistuja qPCR-tutkimuksia. Spesifisesti *H. eratoon* kohdistuvia tutkimuksia ei ole lainkaan, joten hyvien vertailugeenien valintaa varten työhön tehtiin lisävaihe.

Vertailugeenit valittiin useiden eri *Lepidoptera*-lajeille tehtyjen qPCR-tutkimuksien perusteella (Taulukko 3). Usein hyönteis-qPCR:ssä käytetään jotakin ribosomaalisista proteiineista (Rp) ainakin yhtenä vertailugeeninä (Taulukko 3). Muita usein toistuvia geenejä ovat mm. Transcription elongation factor 1 (EF1), Translation initiation factor 4A transporter-like (eIF4A) ja Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Taulukko 3). Useiden geenien välillä on kuitenkin todettu vaihtelua, mm. Piron Prunier et al (2016) totesivat RpS3A-ilmentymistösojen vaihtelevan paljon, vaikka RpS3A onkin usein käytetty vertailugeeni. GAPDH on myös usein eukaryooteissa käytetty vertailugeeni, mutta sen ilmentymisen on osoitettu vaihtelevan huomattavasti eri kudosten ja käsittelyjen välillä (Barber et al. 2005).

Taulukko 3. Hyönteis-qPCR-tutkimuksissa käytettyjä vertailugeenejä.

Lähde	Tutkimuskohde	Vertailugeenit
L. Woestmann et al (2016)	<i>Melitaea cinxia</i>	Mitochondrial ribosomal protein L37 Mitochondrial ribosomal protein S24 Histone variant H2A-Z
Bel et al (2001)	<i>Ostrinia nubilalis</i>	RpS3 Tpi (Triosephosphate Isomerase 1) Idh (Lactose Dehydrogenase) Cadherin
Piron Prunier et al (2016)	<i>Heliconius numata</i> (<i>toukka</i>)	RpL3 (Ribosomal Protein L3) Annexin (Annexin IX-B) eF1a (Elongation factor 1-alpha)

		polyABP (PolyA binding protein)
Liu et al (2016)	<i>Thitarodes armoricanus</i> (toukka)	EF1 (Translation elongation factor 1) eIF4A (Translation initiation factor 4A transporter-like) GAPDH (Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase)
Sun et al (2015)	<i>Sesamia inferens</i>	RpS13 RpS20 EF1
Zhu et al (2014)	<i>Spodoptera exigua</i>	RpL10 EF2 RpL17A
Zhang et al (2015)	<i>Helicoverpa armigera</i>	(Aikuisissa, yleisesti): EF1 RpL27 (Infektion aikana): GAPDH RpL27 beta-Tubulin

Jatkotutkimuksiin valittiin vertailugeenit useiden eri *Lepidoptera*-lajeille tehtyjen qPCR-tutkimuksien perusteella (Taulukko 3). Näiden geenien sekvenssit löytyivät *H. erato* -lajille ENSEMBL LepBase -tietokannasta, ja niillä oli alustava laskennallinen annotaatio-status “Predicted Protein Coding” tai tunnettu status. Erityisesti ribosomaalisten proteiinien kohdalla käytiin läpi useita vaihtoehtoja, joista parhaiten tunnettu oli RpS3 (Taulukko 4). RpL10A oli vain laskennallisilla metodeilla todettu ja se on eri genomi-kasauksesta (*H. erato lattivita* v1), kuin muut sekvenssit (*H. erato demophoon* v1) (Taulukko 4). Viidelle vertailugeenille (Taulukko 4) tehtiin alustava qPCR-vertailu, jonka perusteella valittiin tasaisesti eri olosuhteissa ilmentyvät kaksi geeniä varsinaisen tutkimuksen vertailugeeneiksi.

Taulukko 4. Valittujen vertailugeenien nimet ja LepBase-askensiokoodit.

Geenin nimi	LepBase-askensiokoodi	Toiminnallisuus
eIF4A	evm.model.Herato0101.458.2	Eukaryoottinen transkription käynnistymiseen osallistuva proteiini
GAPDH	evm.model.Herato0503.88	Glykolyysiin osallistuva entsyymi
EF1	evm.model.Herato1003.184	Eukaryoottinen elogaatiofaktori
RpL10A	HEL_001197	Ribosomaalinen proteiini
RpS3	evm.model.Herato1301.563	Ribosomaalinen proteiini

4.5.2. Kohdegeenit

Kohdegeenien valintaa vaikeutti vähäinen tieto *H. erato* -lajin immuunigeneistä ja niiden toiminnasta. Sekvenssitieto on heikkoa, valtaosa geneistä on tunnistettu vain laskennallisilla metodeilla ja laskennallisen tiedon oikeudesta ei ole kokeellista tietoa. Koska *Lepidoptera*-lahkon immuunipuolustuksen proteiinien tarkka toiminta ei ole tunnettua, ei voitu oikeutetusti valita kaikkia sellaisia kohdegeenejä, jotka ovat käytössä paremmin tunnetuissa lajeissa. Esimerkiksi Toll- ja Imd-immuunipuolustuskaskadien proteiineja käytetään yleisesti immuunigeeni-qPCR:ssä kohdegeeneinä (Woestmann et al. 2017), mutta *H. erato* -lajin kohdalla niitä ei voi oikeutetusti valita. *Heliconius*-lajeissa näiden proteiinien tarkasta toiminnasta ja sekvenssistä tiedetään todella vähän. Vaikka jonkin komponentin geeni-ilmentyminen olisi kohonnut tai laskenut, sitä ei voida perustellusti yhdistää muutoksiin vastustuskyvyssä. PGRP-tunnistajaproteiinit ovat myös yleinen immuuni-qPCR:n kohde. Useiden PGRP-proteiinien valintaa ei voitu oikeuttaa, sillä niiden tarkka toiminta, sijainti ja vuorovaikutus on epäselvää. Joitakin PGRP-sekvenssejä (PGRP A-E) löytyi ENSEMBL Metazoa -tietokannasta (metazoa.ensembl.org) *H. melpomene* -lajille, mutta niiden tarkka toiminta immuunipuolustuksessa ei ole tunnettua. PGRP-proteiinit toimivat sekä immuunipuolustuksen käynnistäjinä, että estäjinä (Bischoff et al. 2006, Tavignot et al. 2017). Ilman tietoa tarkasta toiminnasta, niiden kohonnutta tai laskenutta geeni-ilmentymistä ei voida yhdistää muutoksiin vastustuskyvyssä.

Tutkimuksen kohdegeeneiksi valittiin β GRP1, attasiini, gloveriini ja proPO (Taulukko). Beta1,3-glukaani tunnistajaproteiinin (β GRP1) toiminta on tunnettu, sekä *B. mori*- että *M. sexta* -lajeissa. Sen toiminta on kuvattu tarkasti *M. sexta* -lajissa, ja se toimii rasvakudoksessa ja hemolymfassa, ja tunnistaessaan stimuloi proPO-kaskadin aktivoitumista (Ma & Kanost 2000). Myös AMP-geenien toimintatapa on selkeä, vaikka niiden tarkkoja aktivointiratojen komponentteja ei tunneta. Tähän tutkimukseen valittiin yleiset AMP:t, myös *Lepidoptera*-lajeissa usein esiintyvät attasiini ja gloveriini (Taulukko 5). Lopuksi valittiin toiminnaltaan ja funktionaalisuudeltaan tunnettu proPO (Taulukko 5).

Taulukko 5. Valittujen kohdegeenien nimet ja askensiokoodit LepBase-tietokannassa.

Geenin nimi	LepBase-askensiokoodi	Toiminnallisuus
Attasiini	HEL_006822	AMP, Gram-negatiiviset bakteerit
Gloveriini	evm.TU.Herato1001.180	AMP, Gram-negatiiviset ja -positiiviset bakteerit, sienet
ProPO	evm.TU.Herato0209.38_evm.TU.Herato0209.39	Enkapsulaation käynnistäminen
βGRP	evm.TU.Herato0701.357	PRR, enkapsulaation säätelijä

4.5.3. Alukkeiden suunnittelu

Haluttujen geenien sekvenssejä etsittiin ensin hyvin tunnetuista lajeista, kuten *M. sexta*-, *B. mori*- ja *H. melpomene* -lajeista ENSEMBL Metazoa -tietokannasta. Näiden lajien tunnettua sekvenssitietoa käytettiin BLASTN/TBLASTX-hakuun LepBase-tietokannassa. Alukesuunnitteluun käytetty sekvenssi valittiin BLAST-haun luotettavuuden ja hakutulosten annotaation perusteella. Kaikki käytetyt sekvenssit oli alustavasti annotoitu LepBase-tietokannassa “Predicted Protein Coding” -statuksella ja niille oli olemassa olevat vertailevat tutkimus-, ortologi- ja paralogitiedot sekä geenipuu. LepBase-tietokannasta löydettyä sekvenssiä käytettiin alukkeiden suunnitteluun käyttämällä PrimerQuest-työkalua (IDT PrimerQuest 2012). PrimerQuest-suunnittelutyökalun perusasetuksiin tehtiin joitakin muutoksia (Taulukko 6). Alukkeiden ominaisuuksille on yleisesti hyväksyttyjä suosituksia. Alukkeiden GC% kuvaa guaniinin ja sytosiinin suhteellista osuutta sekvenssissä. Alukkeiden GC% vaikuttaa lopputuotteen vakauteen ja alukkeen sulamislämpötilaan (Arya

et al. 2005, Bustin & Huggett 2017, Thornton & Basu 2011). qPCR-sykliit ovat lyhyitä ja lämpötilat ovat matalia, joten amplikonin koon tulee olla alle 150 nukleotidiä pitkä (Arya et al. 2005, Bustin & Huggett 2017, Thornton & Basu 2011).

Taulukko 6. Alukkeiden rajoitteet.

Alukkeen sulamislämpötila (T _m)	50 - 60 °C
Alukkeen GC%	35-65%
Primerin pituus	18-30 nt
Amplikonin koko	80-150 nt

T_m (engl. Melting Temperature), nt (nukleotidi)

Jotta alukkeet eivät sitoutuisi genomiselle DNA:lle alukkeet suunniteltiin niin, että ainakin toinen alukkeista sitoutuisi eksoni-eksoniliitoskohdalle. Jokaiselle geenille asetettiin LepBase-sekvenssin pohjalta selvitetty eksonirajojen kohta (alkavan eksonin 3'-pään sijainti cDNA-sekvenssissä) "Design Across Junctions" -syötelaatikkoon. Geeneissä, joissa tunnetaan usea transkripti (esim. eIF4A, RpS3), asetettiin lisäksi poistoalueet (Excluded Region List), jotta samoilla alukkeilla saatiin katettua kaikki transkriptit. *H. erato* -lajilla on hyvin vähän varianttietoa, joten alukkeita ei voitu erityisesti suunnitella välttämään yleisiä pistemutaatioita ja polymorfioita. Jokaisen sekvenssin kohdalla tehtiin CLUSTALW-linjaus joko LepBasen omalla työkalulla tai EMBL-EBI Clustal Omega -selaintyökalulla (EMBL-EBI Clustal Omega). Linjauskohteina käytettiin *H. melpomene* -lajin annotoituja vastaavia geenejä, ja alukkeet pyrittiin saamaan lajien välille konservoituneille alueille.

LepBasen BLAST-työkalua käytettiin varmistamaan, että kumpikaan geenin alukkeista ei sitoudu muihin geeneihin. BLAST-työkalulla löytyi yksittäisiä osittaisia osumia vääristä kohteista, mutta molempia alukkeita ei löytynyt kertaakaan löytynyt vääristä kohteista. Amplikonin sekundaarirakenteiden selvittäminen tehtiin IDT Unafold-selaintyökalulla

(Integrated DNA Technologies UNAFold) asetuksilla: Mg²⁺ concentration: 3mM, Temperature: 60 °C. Lopulta kaikkien alukkeiden väliset kaksoisrakenteet tarkistettiin ThermoFisherin Multiple Primer Analyzer -selaintyökalulla (ThermoFisher Scientific Multiple Primer Analyzer). Alukkeet, jotka eivät olleet spesifisiä vain kohdesekvenssille tai joilla oli todella vakaita sekundaarirakenteita hylättiin. Vakaa sekundaarirakenne on Gibbsin vapaan energian arvo (ΔG), joka on alle -6 kun kyseessä on primerin ja amplikonin välinen kaksoisrakenne, ja alle -3 kun kyseessä on primer-dimer (Thornton & Basu 2011). Myös epävakaat rakenteet amplikonissa, jotka voivat estää alukkeiden sitoutumisen kuten 3'- tai 5'-hiuspinnirakenteet hylättiin (Thornton & Basu 2011). Alukkeet tilattiin Metabion International AG:lta (www.metabion.com) (Taulukko 7, Taulukko 8).

Taulukko 7. Suunnitellut vertailugeenialukkeet ja niiden laskennallinen sulamislämpötila ja GC%. Lihavoituna näkyvät qPCR-testin perusteella valitut alukkeet.

Nimi	F-aluke	R-aluke	GC% F / R	Tm F / R
eIF4A	CTATTTGTA CTTGTGATGAAGCT GATG	ACTTGCACATCAGAAGACAG	50 / 50	62 / 62
GAPDH	GGACAGACTGCTAGGTTATTC	TCAAGTGCATCGCTATACTG	47.6 / 45	60 / 60
	TTATGTTGCGACGAGGAATC	CACTTATGTCCATAATCTGTG GTA	45 / 37.5	60 / 60
EF1	CCGGAGACAATGTAGGTTTC	TTGGGTGGGTGTTCTTG	50 / 50	60 / 60
RP10L	CTCAACAAGGCCGGTAAAT	TGATGGTAGCCTTAACTTCATC	47.4 / 40.9	60 / 60
	TCTGTGGCTGTAGGACAT	GACACTAAGAAGTTGATTGA AAGG	50 / 37.5	60 / 60
RPS3	TGCGAGGTTGTAGTGTCT	ATTACATGGGTCTCCAGAGT	50 / 45	60 / 60
	CCAACTCTGAACTGAGAGAG	CCTTTCTAATGCACACATCTC	59 / 59	50 / 42.9

GAGGTTGTAGTGTCTGGTAAAC GGTCTCCAGAGTGGATCAT 45.5 / 52.6 60 / 60
 F-alue (Forward-alue), R-alue (Reverse-alue), Tm (Sulamislämpötila).

Taulukko 8. Kohdegeenialukkeiden sekvenssit ja niiden laskennallinen sulamislämpötila ja GC%. Lihavoituina näkyvät qPCR-testin perusteella valitut lopulliset alukkeet.

Nimi	F-alue	R-alue	GC% F / R	Tm F / R
Attasiini	TCTCAGACCTGATGGACTC	TGACGATTAAACATTGTCCAA G	60/ 38.1	59 / 59
	TGGACAATGTTAATCGTCATAG	GTCGTTGTGGAAGACGTT	36.4 / 50	58 / 60
Gloveriini	GATGACTCCTACCCAGAATG	CCATCGCCTATCTGCTTAT	50 / 47.4	59 / 59
	GGAGGTCTTAAGTGAAGAAT	GCTTGATAAGAGGTGCCA	42.9 / 50	59 / 59
ProPO	ACCTTAGGAAACATGGTAGAG	AAGGATTCAAGGTAACGAT TAG	40 / 36.4	58 / 58
	GATGATGGACTGGTGGTAAC	CACCGTTTGGCAGTCTAA	50 / 50	60 / 60
βGRP1	CGCAGGACCAGTTCTATC	ATACCATCAGGTCTCCAAAT TA	55.6 / 36.4	59 / 59
	TTCCCTCAAGAACCAGATTAT	GGTGAGAGTGGGTGAAAT	38.1 / 50	59 / 59

F-alue (Forward-alue), R-alue (Reverse-alue), Tm (Sulamislämpötila).

4.6. qPCR-työn suunnittelu, toteutus ja laadunarviointi

4.6.1. qPCR-työssä käytetyt laitteet ja reagenssit

Kaikkiin qPCR-töihin käytettiin BioRad CFX 384 Real-Time System C1000 Thermal Cyclor -laitetta ja BioRad iQ SYBR Green Supermix -valmistetta. Tämän kitin polymeraasi on iTaq. Reaktioden tilavuus oli 10 µl, josta 1 µl cDNA:ta, 5 µl Supermixiä ja loput alukkeita ja vettä. Alukkeiden pitoisuus oli 200 nM. Levyinä käytettiin BioRadin Hard-Shell PCR plates 384-well, thin wall -levyjä (HSP3805), joiden pohjaväri on valkoinen. Lisäksi levyt suljettiin BioRadin omilla läpinäkyvillä tarroilla (BioRad Microseal ‘B’ seal Seals, #MSB1001).

4.6.2. Gradientti-qPCR

Gradientti-qPCR ajettiin selvittämään kontrolligeenialukkeille optimaalinen sitoutumislämpötila (T_a). Sitoutumislämpötila on alukkeen toiminnan kannalta tärkeämpi, kuin sulamislämpötila (T_m) (Bustin & Huggett 2017). Sitoutumislämpötila kuvaa sitä lämpötilaa, jossa valtaosa aluketta on sitoutunut kohteeseen (Bustin & Huggett 2017). Sitoutumislämpötila on selvitettävä kokeellisesti. Gradientti-qPCR ajo ajettiin noin kymmenen asteen lämpötilagradientilla astevälillä 55,2 - 64,8 °C. Alukesuunnittelusta tiedettiin alukkeiden arvioidut laskennalliset sulamislämpötilat, minkä takia gradientti rajattiin 60 °C ympärille. Lämpötilapisteet olivat portaittain: 55,2, 56,8, 58,4, 59,1, 60,6, 61,6, 63,4, 64,8 °C, koneen ehdotuksesta. Kaikista alukepareista eri lämpötilapisteissä käytettiin kolmea teknistä replikaattia ja yhtä vesikaivoa (Non-template control, NTC), jossa cDNA on korvattu vedellä. Ajo on muuten standardi SYBR-green ajo (Taulukko 9).

Taulukko 9. Gradientti qPCR-ajon parametrit.

Alkudenaturaatio (95 °C)	3 min
1. Denaturaatio	95 °C 10s
2. Kiinnittyminen/Elongaatio	Gradienttilämpötilat 35s
- 40 sykliä	Toista kohdat 1 ja 2.
Sulamiskäyrät	55→ 95 °C, nousua 0,5 °C asteen pykälissä

4.6.3. Standardisuora-ajot

Standardisuora-ajoilla varmistetaan alukkeiden monistuksen tehokkuus mittaamalla C_t -arvoja laimennossarjassa. Tein kuusipisteisen 1:3 laimennossarjan kontrolligeeneille ja kuusipisteisen 1:2 laimennoksen immuunigeeneille. qPCR-reaktion tehokkuus kuvaa onko PCR-reaktio täydellinen, eli toteutuuko joka syklissä täydellinen templaatin tuplaantuminen. 100% tehokkuus kuvaa sitä, että templaatti tasan kaksinkertaistuu joka syklissä. Kuusipisteisen laimennossarjan pisteet per geeni tulisi asettua lineaariselle

suoralle, kun Ct-arvot taulukoidaan. qPCR reaktion tehokkuus (E) on arvo, johon vaikuttaa standardisuoran kulmakerroin (kk):

$$E = 10^{(-1/kk)} - 1$$

Pienetkin erot kulmakertoimessa vaikuttavat tehokkuuteen. Luotettava tehokkuus koetaan olevan 95-105%:n välillä (Bustin & Huggett 2017). Hyväksytyltä alueelta poikkeavat arvot voivat viitata useisiin virheisiin: pipetointivirheisiin laimennossarjasta, alukkeiden suunnitteluvirheisiin ja esimerkiksi kontaminaatioon jossakin pipetoinnin vaiheessa.

Kulmakertoimen ja tehokkuuden lisäksi standardisuoralle lasketaan R^2 -arvo, joka kuvaa kuinka tarkasti edellisten arvojen perusteella voi arvata seuraavan arvon (tai toisin sanoen, kuinka hyvin standardisuoran datapisteet asettuvat standardisuoralle). Kun R^2 -arvo on 0, tulokset ovat satunnaisia ja kun R^2 -arvo on 1, seuraava arvo on täysin pääteltävissä edellisten perusteella. Tehokkuus, jonka standardisuoran R^2 -arvo on suurempi kuin 0,995 on luotettava tehokkuus. Standardisuora-ajo suoritettiin muuten tyyppillisellä qPCR-ajolla (Taulukko 10).

Taulukko 10. qPCR-ajon parametrit.

Alkudenaturaatio (95 °C)	3 min
1. Denaturaatio	95 °C 10s
2. Kiinnittyminen/Elongaatio	59 °C 35s
- 40 sykliä	Toista kohdat 1 ja 2.
Sulamiskäyrät	55→ 95 °C, nousua 0,5 °C asteen pykälissä

4.6.4. Vertailugeenien testaus ja valinta

Vertailugeenien vakaus eri olosuhteissa varmistettiin erillisellä qPCR-kokeella. Kokeeseen valittiin alukkeet, joiden tehokkuus standardisuora-ajojen perusteella oli 95-105%:n välillä. Selvityksessä käytettiin kolmea kuivaa ja kolmea kosteaa näytettä, ja kolmea teknistä

replikaattia sekä yhtä vesikaivoa. Työ suoritettiin kahdessa eri ajossa, jolloin kolmesta kuivasta ja kolmesta kosteasta näytteestä tuli jokaisesta kaksi biologista replikaattia. qPCR ajojen tulokset syötettiin kolmeen algoritmiin: Genorm, NormFinder ja RefFinder. Algoritmien syötteenä käytettiin yhteensä 48:aa Ct-kaivokeskiarvoa. Suuret poikkeavat havainnot poistettiin ennen analyysiä. Algoritmeja käytettiin niiden dokumentaation mukaisesti. NormFinderia käytettiin sen R-paketilla (NormFinder 2015). GeNorm-algoritmia käytettiin SLqPCR R-paketin avulla sen oman dokumentaation mukaisesti (Kohl 2018). RefFinder-algoritmillä ei ole varsinaista dokumentaatiota.

4.6.5. qPCR-työ ja laaduntarkkailu

Kaikissa töissä ja qPCR-työn kaikilla levyillä tehtiin sulamiskäyräanalyysi, selvittämään muodostuuko primer-dimereitä. Lisäksi joka levyllä oli vesikontrolli jokaista aluketta kohden. Työ tehtiin näytteiden määrän takia neljässä eri ajossa, ja jokaisesta ajosta tehtiin duplikaattilevy (Taulukko 10). Jokaisella levyllä oli 14-15 näytettä ja kaikki geenit per näyte, sekä vesikontrollit. Molempien ajojen tuloksille laskettiin ΔC_t -arvot, joiden välillä oleva ero sai olla korkeintaan 0,5. Jos ΔC_t -arvojen ero oli yli 0,5, näytteet ajettiin uudestaan. Lisäksi näytteiden kaivoreplikaattien keskihajonta sai olla korkeintaan 0,25 tai ne koettiin epäluotettaviksi. Osa näytteistä ajettiin uudelleen, koska kahden ensimmäisen levyn ΔC_t -arvot erosivat toisistaan liikaa tai kaivoreplikaattien keskihajonta oli liian suuri.

4.7. qPCR-tulosten analysointi

4.7.1. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metodi

Ajon jälkeen tulokset analysoitiin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metodilla. Livak ja Schmittgen esittelivät $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metodin vuonna 2001 (Livak & Schmittgen 2001). Metodi on laajassa käytössä qPCR-kirjallisuudessa. Metodissa normalisoidaan kohdegeenien Ct-arvoja kontrolligeenien Ct-arvoilla. Metodin lopputulos on suhteellinen arvo, jossa geeni normalisoidaan vertailugeenillä.

4.7.1.1. Normalisointi

Työssä oli kaksi vertailugeeniä, joten molempien geenien kohdalla laskettiin ensin kaivoreplikaattien Ct-arvojen keskiarvo, ja sitten laskettiin näiden kahden saadun Ct-arvon välinen keskiarvo kahden vertailugeenin väillä. Myös tutkittavien immuunigeenien kohdalla käytettiin kaivokeskiarvoa.

$$\Delta Ct (\text{Geeni}) = Ct\text{-kaivokeskiarvo (Immuunigeeni)} - Ct\text{-kiavokeskiarvo (Vertailugeenit)}$$

ΔCt -arvot yhdistettiin per olosuhde ja per geeni, niin että saatiin yhteensä 12 arvoa:

Attasiini-Kuiva, Attasiini-Keskiverto, Attasiini-Kostea, Gloveriini-Kuiva ja niin edelleen, ottamalla ryhmän sisäisten ΔCt -arvojen keskiarvo. Keskiarvoitettuja ΔCt -arvoja vertailtiin keskenään vertailemalla saman geenin ilmentymistä eri olosuhteissa:

$$\Delta \Delta Ct (\text{Geeni}) = \Delta Ct\text{-keskiarvo (Immuunigeeni, Olosuhde 1)} - \Delta Ct\text{-keskiarvo (Immuunigeeni, Olosuhde 2)}$$

Saatu $\Delta \Delta Ct$ -arvo, nostettiin toiseen potenssiin, jolloin saatiin $2^{-\Delta \Delta Ct}$ -arvo. Tämä arvo kuvaa geenin suhteellista ilmentymistä eli kuinka monta kertaa enemmän tai vähemmän geeni ilmentyy keskenään verratuissa olosuhteissa (engl. Fold Change). Tämä arvo perustuu qPCR menetelmän oletukseen siitä, että jokaisessa PCR-syklissä monistettava DNA kaksinkertaistuu (Livak & Schmittgen 2001). Jos qPCR reaktion tehokkuus kohde- tai vertailugeeneissä poikkeaa huomattavasti 100%:n reaktiotehokkuudesta, $2^{-\Delta \Delta Ct}$ -menetelmää ei voi oikeutetusti käyttää (Livak & Schmittgen 2001). Tutkimuksen geenien alukkeiden tehokkuus on yleisesti hyväksytyllä välillä 95-105%.

4.7.1.2. Hajonta ja keskivirhe

$2^{-\Delta \Delta Ct}$ -arvojen keskivirhe laskettiin Ct-arvojen keskihajonnasta virheen kasautumislain mukaisesti.

Ct-arvojen keskihajonta :

$$sd = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 (Ct - Ct(keskiarvo))^2}{n}}$$

Arvo laskettiin kohdegeenien Ct-arvoille ja vertailugeenien Ct-arvoille. ΔCt -arvojen keskihajonta saatiin yhdistämällä kohde- ja vertailugeenin keskihajonta.

ΔCt -arvojen keskihajonta:

$$dsd = \sqrt{sd(kohdegeeni)^2 + sd(vertailugeeni)^2}$$

Ja koska työssä jokaiselle geenille laskettiin kaksi ΔCt -arvoa (duplikaattilevyt), lopullinen tutkimuksessa käytetty keskiarvon keskivirheen arvo (s.e.m) saatiin:

$$s.e.m. = \sqrt{dsd_1^2 + dsd_2^2}$$

ΔCt -arvojen 95% luottamusväli laskettiin:

$$\text{Alaraja, yläraja} = \text{keskiarvo} \pm 1.96 \cdot \frac{s.e.m}{\sqrt{n}}$$

Jossa n on otoskoko.

$\Delta \Delta Ct$ -arvojen (eli kahden alueen keskiarvojen erotus) 95%:n luottamusväli laskettiin:

$$\text{Alaraja, yläraja} = \Delta \Delta Ct \pm 1.96 \cdot \sqrt{\left(\frac{s.e.m_1}{n_1}\right)^2 + \left(\frac{s.e.m_2}{n_2}\right)^2}$$

Tätä luottamusväliä käytettiin selvittämään voiko keskiarvoilla olla tilastollisesti merkitsevä ero isommassa aineistossa. Keskiarvon 95%:n luottamusväli kuvaa millä välillä perusjoukon todellinen keskiarvo on 95%:n todennäköisyydellä. Du Prel et al. 2009 esittivät, että p-arvo testauksen ja luottamusvälitestauksen käyttäminen yhdessä tuottaa luotettavia ja toisiaan täydentäviä tuloksia. Keskiarvoilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa jos $\Delta\Delta\text{Ct}$ -arvojen ala- ja ylärajan välillä oli arvo nolla (eli jos keskiarvojen erotuksen mahdollinen tulos on se, että keskiarvoilla ei ole eroa). Jos väli ei sisältänyt nollaa, oli mahdollista että perusjoukossa olevaa todellista ilmentymiseroa ei onnistuttu kuvaamaan tässä aineistossa.

4.7.1.3. Tilastollinen testaus

Studentin t-testi on tarkoitettu testaamaan nollahypoteesia, jonka oletus on että kahden normaalijakautuneen satunnaismuuttujajoukon keskiarvot ovat yhtä suuret. T-testin oletuksiin kuuluu normaalijakautuneisuus ja varianssin yhtäsuuruus. Koska tutkimuksen otoskoko oli suhteellisen pieni, joten normaalijakautuneisuutta testattiin Shapiro-Wilkin testillä. Shapiro-Wilkin testin nollahypoteesi on, että aineisto on normaalijakautunut. Shapiro-Wilkin testaamiseen käytettiin R-funktiota `shapiro.test`. ΔCt -arvojen varianssia testattiin F-testillä. Enkapsulaatioarvojen tilastollisessa testauksessa käytettiin T-testiä ja F-testiä. T-testin ja F-testin suorittamiseen käytettiin R-funktiota `t.test` ja `var.test`. Koska näytteiden määrät erosivat toisistaan, T-testi ajettiin kaksisuuntaisena ja kahdella näyteryhmällä. Jos F-testi tuotti merkittävän eron, T-testi ajettiin ilman oletusta varianssin yhtäsuuruudesta.

Immuunigeenien ilmentymisen välisten erojen määrittämiseen käytettiin Mann-Whitneyn U-testiä. Mann-Whitneyn U-testi on ei-parametrinen tilastollinen testi, jonka nollahypoteesi on oletus että satunnaisvalittu arvo toisesta on yhtä todennäköisesti suurempi tai pienempi kuin satunnaisvalittu arvo toisesta aineistosta. Mann-Whitneyn U-testin oletuksena on toisistaan riippumattomat aineistot ja samankaltainen jakauma, mutta ei normaalijakautuneisuutta. Mann-Whitneyn U-testiä käytettiin R-funktiolla `wilcox.test`. Korrelaatiokertoimenä käytettiin Kendallin järjestyskorrelaatiokerrointa (τ). Kendallin τ on ei-parametrinen tilastollinen testi kahden aineiston välisen korrelaation

mittaamiseen. Kendallin tau-testi tehtiin R-funktiolla `cor`. Immuunigeenien ja immuunigeenien ja enkapsulaatioarvojen välistä suhdetta määritettiin lineaariregressioanalyysillä. Lineaariregressioanalyysiin käytettiin R-funktiota `lm`. Kuvaajiin käytettiin R-kirjastoa `ggplot2`.

5. Tulokset

5.1. RNA-eristys

RNA eristys oli pääosin onnistunut. RNA-eristys epäonnistui viidestä näytteestä. Nanodropilla mitattujen RNA-näytteiden pitoisuus vaihteli 66-488 ng/μl välillä, ja mediaani pitoisuuksille oli 174 ng/μl. A260/A280 suhteet vaihtelivat välillä 1,89 - 2,6. A260/230 suhde oli valtaosassa näytteitä yli 2. Puhtaan RNA:n A260/280 suhde on tasan 2,0 ja A260/230 suhteen tulisi olla myös noin 2. Viisi näytettä hylättiin liian alhaisen pitoisuuden vuoksi. RNA näytteiden ehjyyttä arvioitiin BioAnalyzerillä. RIN-arvoja ei tässä lajissa voida saada, koska *H. eratolla* ei ole 18S ribosomaalista RNA:ta. BioAnalyzerin tulokset eivät kuitenkaan näyttäneet merkkejä RNA-degradaatiosta.

5.2. cDNA-käännös

cDNA-käännökset onnistuivat pääosin. Kaksi näytettä jouduttiin hylkäämään erittäin matalien pitoisuuksien takia, joiden vuoksi matalasti ilmentyvät immuunigeenit eivät tuottaneet Ct-arvoja qPCR:ssä. Näytteillä oli hyvä RNA pitoisuus, mutta cDNA:ta ei jostain syystä muodostunut riittävästi. Näytteet käännettiin RNA-näytteestä kertaalleen uudelleen, mutta uudenkin cDNA-käännöksen kohdalla qPCR ei onnistunut. On epäselvää miksi nämä kaksi näytettä epäonnistuivat. Mahdollinen syy voi olla, että RNA on näissä näytteissä ollut degradoitunut, jolloin täyspitkää cDNA:ta ei muodostuisi riittävästi.

5.3. qPCR-työn vaiheet

5.3.1. Gradientti-qPCR

Reaktio tapahtui suurin piirtein samalla tehokkuudella lämpötilavälillä 56-62 °C. Ct-arvot tällä välillä olivat lähes yhtä suuria. Alukkeet, jotka toimivat laajalla lämpötila-alueella ovat laadukkaita alukkeita (Bustin & Huggett 2017). Matalimpia Ct-arvoja tuottivat lämpötilat välillä 59-60 °C. Päätyön lämpötilaksi valittiin 59 °C. Kontrollien ja tutkittavien näytteiden sulamiskäyrät eivät näyttäneet epäpuhtauksia tai poikkeuksellista monistumista.

5.3.2. Standardisuora

Standardisuora-ajot ajettiin useita kertoja, koska osassa ajoissa kaivoreplikaattien keskihajonta oli yli 0,25 tai saadun standardisuoran R^2 -arvo oli liian pieni ($< 0,995$). Standardisuora-ajon perusteella valittujen alukkeiden tehokkuus oli välillä 95-105%. Standardisuora-ajojen ja kontrolligeenien analyysin perusteella lopullisiksi alukkeiksi valittiin gloveriinin aluke 2, β GRP1:n aluke 2, proPO:n aluke 2, GAPDH:n aluke 2, Attasiinin aluke 2, ja eIF4A aluke 1. Myös EF1:n aluke 3 ja RP10L:n aluke 2 saivat hyvän tehokkuuden. Valittujen alukkeiden sekvenssit ovat taulukoitu kappaleessa 'Alukkeiden suunnittelu' (Taulukko 6, Taulukko 7).

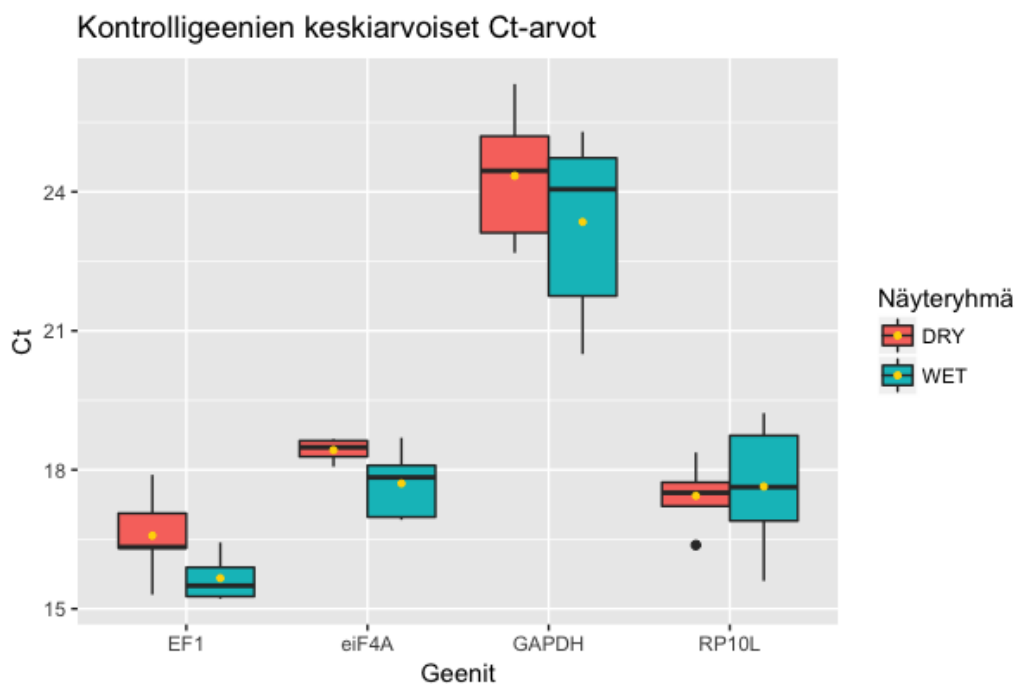
5.3.3. Kontrolligeenien valinta

5.3.3.1. Kontrolligeenien qPCR-ajo

Kontrolligeenien valinta tehtiin kuudella kasvihuoneessa kasvatetulla perhosnäytteellä. Kolme näytteistä oli kuivista ja kolme kosteista olosuhteista. Kaikista kuudesta näytteestä tehtiin kaksi biologista replikaattia, jolloin yhteensä analysoitiin 12 näytteen ryhmä. Näytteet ajettiin valituissa qPCR-olosuhteissa ja tehokkuudeltaan vahvistetuilla alukkeilla. Näytteiden Ct-arvojen analysoinnissa käytettiin F-testiä ja T-testiä. F-testien tulokset eivät hyllänneet nollahypoteesia, jolloin näytteiden varianssit voitiin olettaa yhtäsuuruisiksi. Myös yksikään T-testin tulos ei kyennyt hylkäämään nollahypoteesia 95% merkitsevyystasolla. Yhdenkään kontrolligeeniehdokkaan ilmentyminen ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi kuivissa ja kosteissa olosuhteissa (Taulukko 11, Kuva 3).

Taulukko 11. Kontrolligeenien Ct-arvojen tilastollisia tunnusarvoja.

Ct-arvot	eIF4A	EF1	GAPDH	RP10L
Keskiarvo kuiva	18,9	16,6	24,3	17,4
Keskiarvo kostea	17,8	15,4	23,3	17,6
Keskihajonta kuiva	1,1	1,0	1,3	2,2
Keskihajonta kostea	0,8	0,7	1,8	1,4
F-testi (p-arvo)	0,6	0,6	0,4	0,3
T-testi (p-arvo)	0,1	0,1	0,3	0,8



Kuva 3. Kontrolligeeni-ehdokkaiden Ct-arvot kuivan ja kostean alueen näytteissä. Ct-arvot kuivissa ja kosteissa olosuhteissa EF1, eIF4A, GAPDH ja RP10L-geeneille. Laatikko kuvaa 25 - 75 % kvartiilejä, hännät 10% ja 90% luottamustasoja, musta viiva mediaania ja kultainen pallo keskiarvoa. Aineistosta poistettiin suuret poikkeavat havainnot (kaksi RP10L-arvoa) ennen kuvan tekoa.

5.3.3.2. GeNorm

Genorm-algoritmin tuloksena saatiin kaksi suositusparia EF1 - eIF4A, sekä GAPDH-RP10L, mutta kumpikaan pareista ei alittanut algoritmin parittaisen variaation ylärajaa 0,15. Näin ollen GeNorm-työkalu ei voinut suositella tästä aineistosta yhtäkään soveliaista paria.

5.3.3.3. NormFinder

NormFinder-työkalun osoittamat parhaat geeniparit olivat eIF4A-GAPDH (vakauservo = 0,27) ja GAPDH-RP10L (vakauservo = 0,27). NormFinderissä merkitsevät tulokset saavat vakauservon alle 0,25, joka ei alittunut kummassakaan parissa.

5.3.3.4. RefFinder

RefFinder työkalun tulokset poikkesivat toisista algoritmeista, ilmeisesti koska RefFinder ajoon ei voi sisällyttää tietoa ryhmistä. Pelkässä NormFinder ajossa parhaat tulokset saivat eIF4A-GAPDH ja GAPDH-RP10L, mutta RefFinder-ajossa NormFinderin paras tulos oli GAPDH-EF1 (Vakauservot: GAPDH 0,599, EF1 0,902, eIF4A 0,952 ja RP10L 1,137). NormFinder algoritmin dokumentaatiossa hyväksyttävä vakauservo on alle 0,25.

RefFinder-työkalu ei ilmoita mikä NormFinderin vakauservojen merkitsevyysraja on, eikä myöskään sitä milloin se on kaikkien näiden geenien kohdalla ylitetty. Vastaavasti pelkässä GeNorm ajossa paras tulos oli EF1-eIF4A ja GAPDH-RP10L, mutta RefFinder-ajossa paras tulos oli EF1-GAPDH (vakauservot EF1 = 0,875, GAPDH = 0,875, eIF4A = 1,157 ja RP10L = 1,283). GeNorm -algoritmin hyväksyttävä vakauservo on alle 1,5, tässä se alittuu EF1 ja GAPDH geeneissä, mutta pari ei ollut pelkän GeNorm ajon suositus.

5.3.3.5. Valittu vertailugeenipari

NormFinder-algoritmi on ainoa, joka suoraan vertailee samaa geeniä eri olosuhteissa, jonka takia se koettiin parhaaksi työkaluksi tässä tutkimuksessa. RefFinder-työkaluun ei näillä syötteillä tai tuloksilla voi luottaa, sillä sen tulokset eroavat suositusten mukaan ajetuista algoritmien tuloksista. RefFinder-työkaluun syötetään Ct-arvot eri tavalla kuin algoritmien omissa suosituksissa, mm. ryhmätietoa ei syötetä lainkaan. Ilman ryhmätietoa on epäselvää, miten luotettavaksi paritukset voidaan olettaa, ja on epäilyttävää että

algoritmien omia merkitsevyyksiä ei mainita alkuperäisessä julkaisussa tai algoritmin yhteydessä.

Tutkimuksen vertailugeenipariksi valittiin NormFinder työkalun toinen suosituspari GAPDH-eIF4A. Toinen saman tuloksen saanut NormFinder RP10L-GAPDH-pari hylättiin, sillä koedatassa RP10L-geenillä oli todella laaja keskihajonta kuivissa näytteissä (Taulukko). Kaksi Ct-keskiarvoa poistettiin aineistosta, koska niiden kaivokeskihajonta oli suurempi kuin 0,25. NormFinder tulos GAPDH-RP10L -geeniparille (vakauservo = 0,27) ei alita vakauden merkitsevyytensä (vakauservo = 0,25). Mahdollinen syy on pieni määrä näytteitä. Studentin T-testillä ei voitu todeta Ct-arvojen eroavan tilastollisesti merkitsevästi toisistaan (Taulukko 11).

5.4. Vertailugeenien vakaus tutkimusaineistossa

Kaikkien geenien ilmentymisen vakautta tutkimusaineistossa testattiin NormFinderillä. Kaikista tutkimusgeeneistä eIF4A ja GAPDH olivat parhaat, vakauservolla 0,26 (Taulukko 12). Tämä ei riitä alittamaan vakauden merkitsevyytensä (vakauservo 0,25).

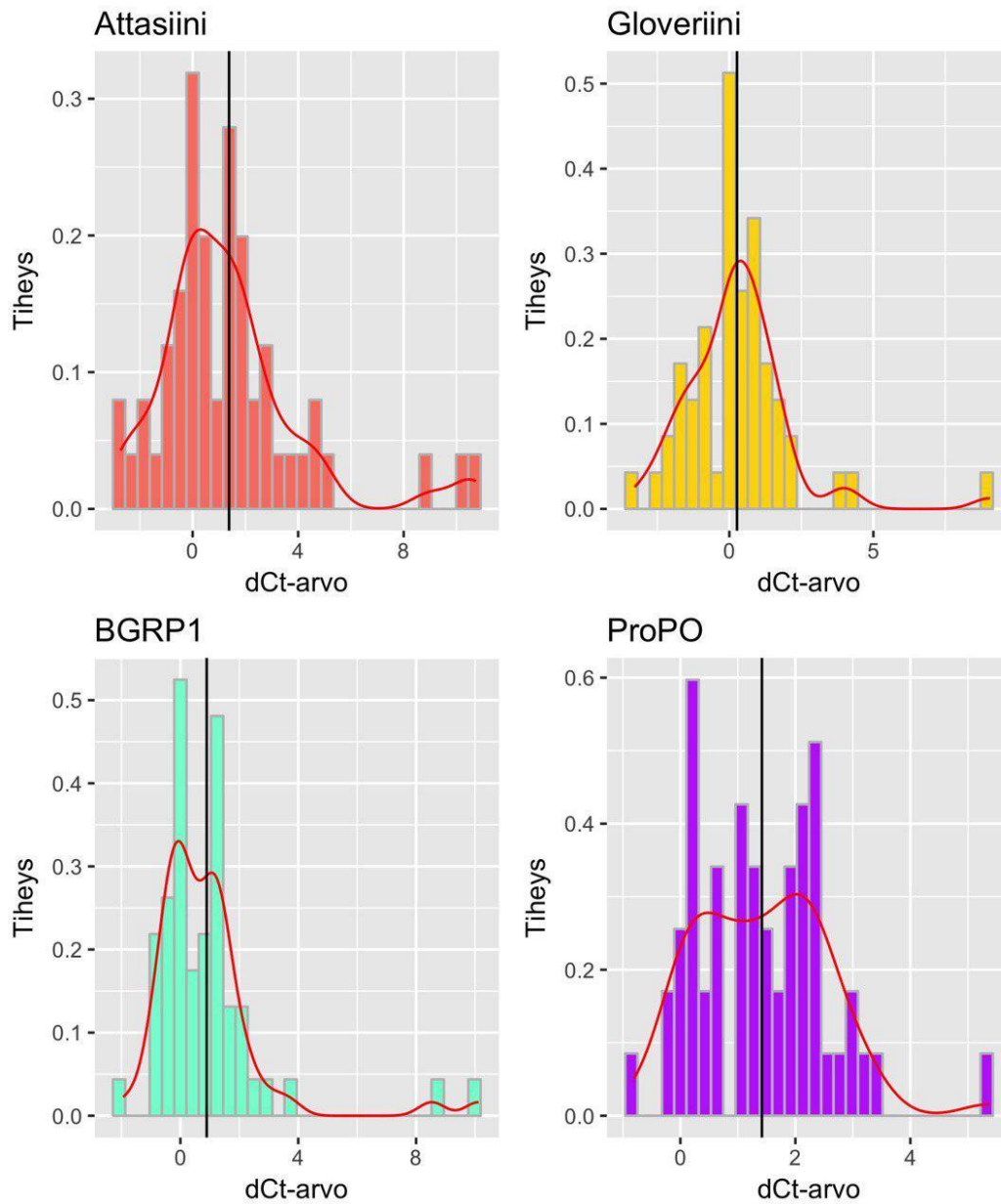
Taulukko 12. NormFinder-algoritmin tulokset parhaiden geeniparien vakaudesta.

Geeni 1	Geeni 2	Vakauservo
eIF4A	GAPDH	0,26
eIF4A	Gloverin	0,3
eIF4A	βGRP1	0,36
GAPDH	Gloverin	0,39
GAPDH	βGRP1	0,39
Gloverin	βGRP1	0,4

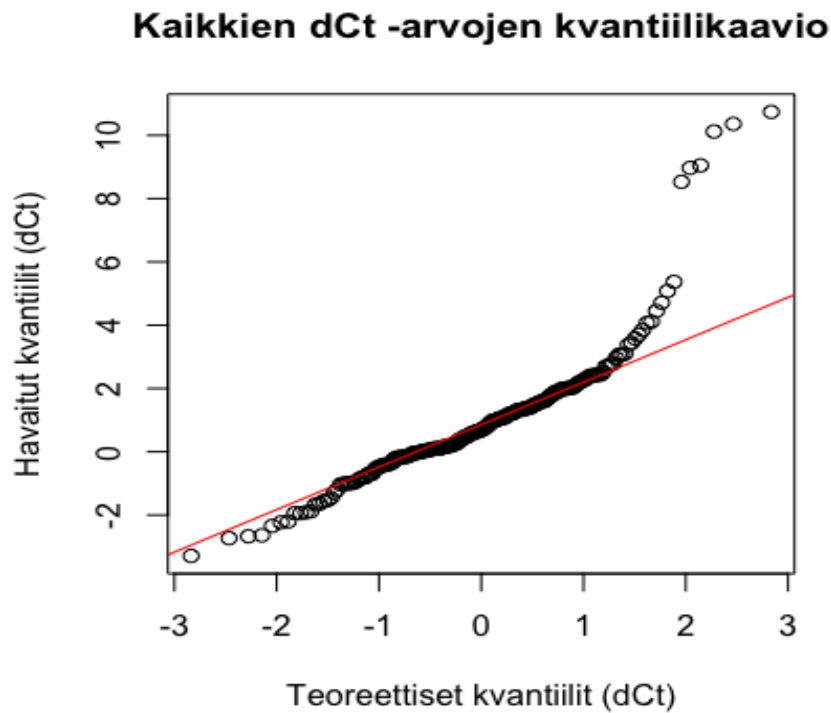
5.5. Tutkimusaineiston normaalijakautuneisuus

5.5.1. Δ Ct-arvot

Studentin T-testin oletuksena on normaalijakautunut aineisto. Immuunigeenien Δ Ct-arvojen tilastollista testaamista varten selvitettiin olivatko Δ Ct-arvot normaalijakautuneet. Normaalijakautuneisuutta havainnollistettiin histogrammilla ja kvantiilikaaviolla Δ Ct-arvoista (Kuva 4, Kuva 5). Koko aineiston keskiarvo oli 0,97, mediaani 0,67, otosvinouskerroin 1,97 ja huipukkuuskerroin 6,99. Otosvinouskertoimen perusteella aineisto oli hieman oikealle vinoutunut, eli keskiarvoa pienempiä Δ Ct-arvoja oli enemmän kuin keskiarvoa suurempia. Poikkeuksellisen korkeita Δ Ct-arvoja (matala ilmentyminen) oli paljon oikeassa hännässä. Huipukkuuskerroin oli voimakkaasti positiivinen, eli jakauman hännillä on odotettua vähemmän arvoja. Shapiro-Wilkin normalisuustesti Δ Ct-arvoista sai arvon $W = 0,84$ ($p = 3,6e-14$), jolloin nollahypoteesi jakauman normalisuudesta voitiin kumota. Tämän takia, ja koska aineisto on pieni ($n = 57$, joista kuivia 14, keskivertoja 23 ja kosteita 17), käytettiin Δ Ct-arvojen analyysissä ei-parametristä Mann-Whitneyn U-testiä parametriseen Studentin T-testin sijasta. Aineiston kuvaajissa oli kuusi poikkeavaa havaintoa (Kuva 4, Kuva 5).



Kuva 4. Immuunigeenien dCt-arvojen histogrammi ja tiheysjakauma. Musta poikkiviiva kuvaa aineiston keskiarvoa. Punainen käyrä on aineiston tiheysjakauma.



Kuva 5. Kvantilikaavio koko aineiston ΔC_t -arvoista. Kvantilikaaviossa vertaillaan kerättyä aineistoa (y) ja normaalijakautunutta aineistoa (x). Punainen viiva kuvaa normaalijakautunutta aineistoa.

Kuusi poikkeavaa arvoa olivat attasiini (8,98, 10,36, 10,74), gloveriini (9,05), β GRP1 (8,53, 10,12), joista kaikki olivat kyseisten geenien 95% luottamusvälin ylärajan yläpuolella (Taulukko 13, ks, myös Kuva 5). Kuusi poikkeavaa arvoa olivat yhteensä kolmesta näytteestä. Kaikkien arvojen kahden ajon ΔC_t -ero oli alle 0,5 ja niiden C_t -arvojen kaivokeskihajonta oli alle 0,25. Yhdenkään näytteen sulamiskäyrissä ei näkynyt poikkeavia tuotteita. Koska tutkimusgeenit ovat imuunigenejä, suuri vaihtelu on ilmentymisessä oletettavaa. Lisäksi saatu ΔC_t -arvo saatiin kahdesta eri qPCR-ajosta. Oletettiin, että kyseessä ei ollut poikkeavia vaan aitoja havaintoja, joten niitä ei poistettu aineistosta.

Taulukko 13. Tilastollisia tunnuslukuja ΔC_t -arvoista kosteusolosuhteittain. Taulukko ala- ja yläraja kuvaavat 95%:n luottamusväliä.

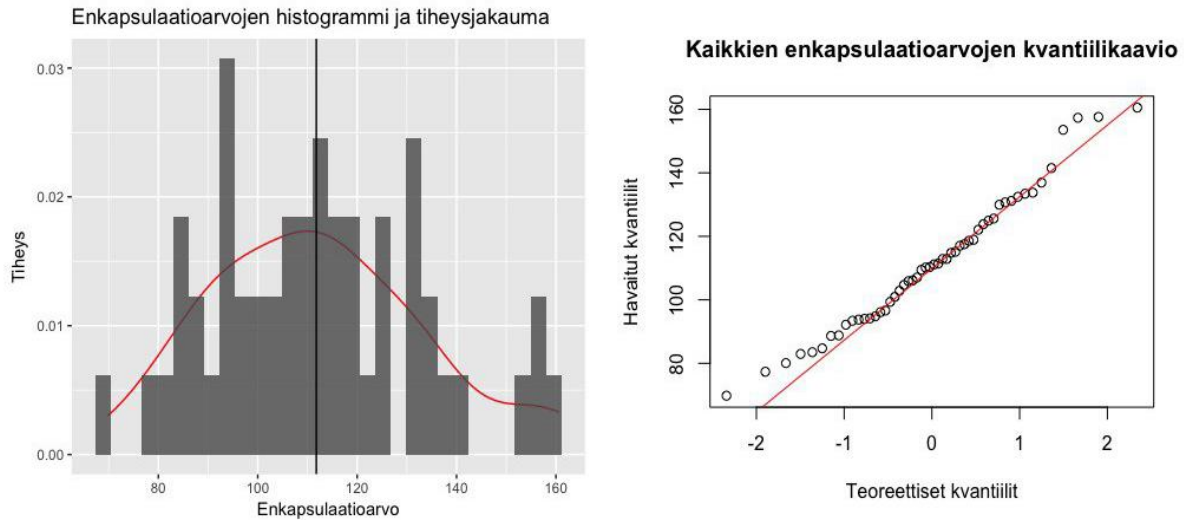
Kuiva	Keskivirhe			
	Keskiarvo	(s.e.m)	Alaraja (CI)	Yläraja (CI)

Attasiini	3,01	0,19	2,64	3,38
Gloveriini	0,24	0,19	-0,13	0,61
β GRP1	1,53	0,20	1,14	1,92
ProPO	1,22	0,18	0,87	1,57
Keskiverto				
Attasiini	0,92	0,20	0,53	1,31
Gloveriini	0,43	0,17	0,10	0,76
β GRP1	0,81	0,19	0,44	1,18
ProPO	1,50	0,20	1,11	1,89
Kostea				
Attasiini	0,66	0,23	0,21	1,11
Gloveriini	-0,07	0,22	-0,50	0,37
β GRP1	0,48	0,22	0,05	0,91
ProPO	1,47	0,20	1,08	1,86

Myös yksittäisten immuunigeenien Δ Ct-jakauman normaalijakautuneisuus testattiin (Kuva 4). Shapiro-Wilkin testitulokset attasiinille ($W = 0,86$, $p = 1,552e-05$), gloveriinille ($W = 0,85$, $p = 1,244e-05$), β GRP1:lle ($W = 0,70$, $p = 3,864e-09$) ja proPO:lle ($W = 0,956$, $p = 0,04233$) kumoavat nollahypoteesin 95% merkitsevyystasolla. Osa-aineistot eivät olleet normaalijakautuneita, joten kaikki Δ Ct-arvojen vertailu tehtiin ei-parametrisellä tilastollisella testillä.

5.5.2. Enkapsulaatioarvot

Enkapsulaatioarvoja havainnollistettiin histogrammilla ja kvartiilikaaviolla (Kuva 6) ja arvoille suoritettiin Shapiro-Wilkin testi. Enkapsulaatioarvojen otosvinous oli 0,28 ja otoshuipukkuus -0,38, eli ne eivät poikkea normaalijakaumasta (Kuva 6). Shapiro-Wilkin testi sai arvon $W = 0,98$ ($p = 0,43$), jolloin nollahypoteesin oletus normaalijakautuneesta aineistosta jäi voimaan. Enkapsulaatioarvot voitiin olettaa normaalijakautuneiksi ja enkapsulaatioarvojen vertailuun voitiin käyttää kaksisuuntaista Studentin T-testiä. F-testi vahvisti, että varianssi ei eronnut merkittävästi kosteusolosuhteiden välillä, joten T-testin oletuksena voitiin käyttää oletusta varianssin yhtäsuuruudesta.



Kuva 6. Enkapsulaatioarvojen histogrammi ja tiheysjakauma sekä kvantiilikaavio.

Histogrammissa punainen kuvaaja on arvojen tiheysjakauma ja musta poikkiviiva on keskiarvo. Kvantiilikaaviossa punainen suora kuvaa normaalijakautunutta aineistoa.

5.6. Immuunigeenien ilmentymistasot

Immuunigeenien ilmentymistasoa vertailtiin olosuhteittain ja sukupuolittain. Lisäksi tutkittiin geenien ilmentymistasojen välisiä suhdetta. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää onko eri kosteusolosuhteiden välillä merkittäviä ilmentymiseroja.

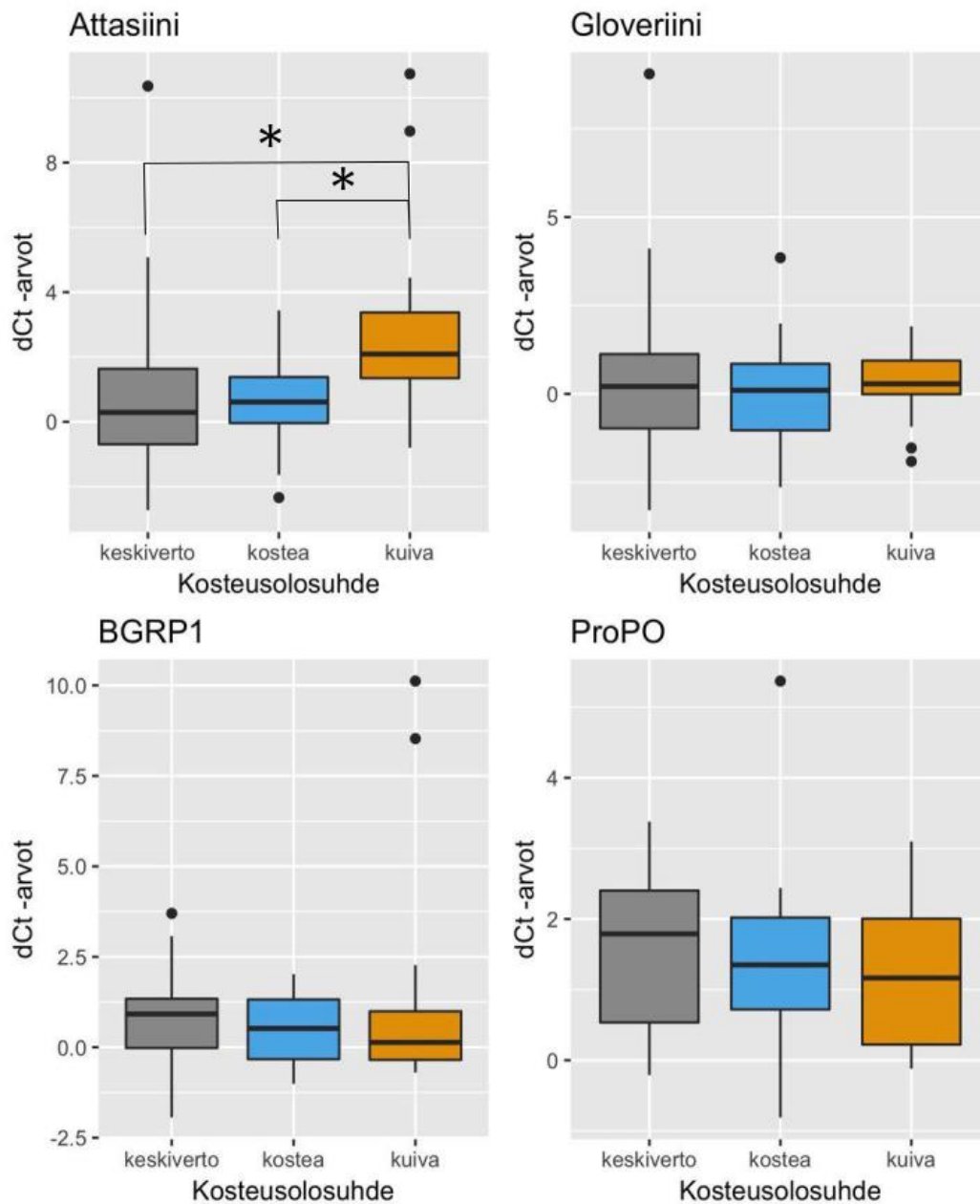
5.6.1. Kosteusolosuhteiden vertailu

Geeni-ilmentymistä vertailtiin parittamalla kosteusolosuhteet: Kuiva-Keskiverto, Kuiva-Kostea ja Keskiverto-Kostea. Kosteusolosuhteiden vertailut tehtiin kaikille neljälle immuunigeenille: attasiinille, gloveriinille, β GRP1:lle ja proPO:lle. Gloveriini-, β GRP1- sekä proPO-geenien ilmentyminen ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi toisistaan yhdessäkään olosuhdevertailussa Mann-Whitneyn U-testin perusteella (Taulukko 14). Attasiinin ilmentyminen taas erosi tilastollisesti merkitsevästi kuivissa olosuhteissa, verrattuna keskivertoihin ($p = 0,014$) ja kosteisiin ($p = 0,017$) olosuhteisiin. Attasiini ilmentyy kuivissa olosuhteissa 4,35 kertaa vähemmän ($2^{-\Delta\Delta C_t} = 0,23$) kuin keskiverroissa ja viisi kertaa vähemmän ($2^{-\Delta\Delta C_t} = 0,20$) kuin kosteissa olosuhteissa (Taulukko 14, Kuva 7).

Taulukko 14. $\Delta\Delta\text{Ct}$, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -arvot ja Log2 FC -arvot olosuhteittain vertailtuina ja arvojen tilastollinen merkitsevyys.

$\Delta\Delta\text{Ct}$ ja 95% luottamusväli	Attasiini	Gloveriini	βGRP1	ProPO
Kuiva / Keskiverto	2,10 (1,8, 2,35)	-0,19 (-0,48, 0,09)	0,72 (0,42, 1,01)	-0,28 (-0,56, 0,01)
Kuiva / Kosteaa	2,35 (2,03, 2,51)	0,30 (-0,02, 0,62)	1,05 (0,72, 1,37)	-0,25 (-0,55, 0,06)
Keskiverto / Kosteaa	0,26 (-0,04, 0,55)	0,50 (-0,22, 0,78)	0,33 (0,04, 0,61)	0,03 (-0,25, 0,31)
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$-arvot				
Kuiva / Keskiverto	0,23	1,14	0,61	1,21
Kuiva / Kosteaa	0,20	0,81	0,48	1,19
Keskiverto / Kosteaa	0,84	0,71	0,80	0,98
Log2 FC -arvot				
Kuiva / Keskiverto	-2.10	0.19	-0.72	0.28
Kuiva / Kosteaa	-2.35	-0.30	-1.05	0.25
Keskiverto / Kosteaa	-0.26	-0.50	-0.33	-0.03
p-arvo:				
Kuiva / Keskiverto	0,014 *	0,856	0,874	0,482
Kuiva / Kosteaa	0,017 *	0,592	0,348	0,677
Keskiverto / Kosteaa	0,646	0,691	0,475	0,701

Luottamusvälianalyysi näyttää myös, että missään olosuhteissa gloveriini ja proPO eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi toisistaan (Taulukko 14). Lisäksi attasiini ja βGRP1 geenien ilmentyminen eri eroa tilastollisesti merkitsevästi keskiverroissa ja kosteissa olosuhteissa (Taulukko 14). βGRP1 -geenin keskiarvojen erotus ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -arvo) kuivissa ja keskiverroissa, sekä kuivissa ja kosteissa olosuhteissa ei sisällä nollaa, eli keskiarvot mahdollisesti eroavat toisistaan. On mahdollista, että βGRP1 -geenin ilmentyminen näissä olosuhteissa eroaisi tilastollisesti merkitsevästi, jos aineisto olisi suurempi. Tämän tutkimuksen perusteella merkitsevyyttä ei voida todeta. 99% luottamusväli βGRP1 :n keskiarvojen erotukselle kuivien ja keskivertojen olosuhteiden välillä on 0,33, 1,10 ja kuivien ja kosteiden 0,62, 1,47. Suuremmassa aineistossa voisi löytyä tilastollisesti merkitsevä ero. Luottamusvälianalyysi vahvistaa suuren eron attasiinin ilmentymisessä kuivissa ja keskiverroissa sekä kuivissa ja kosteissa olosuhteissa.



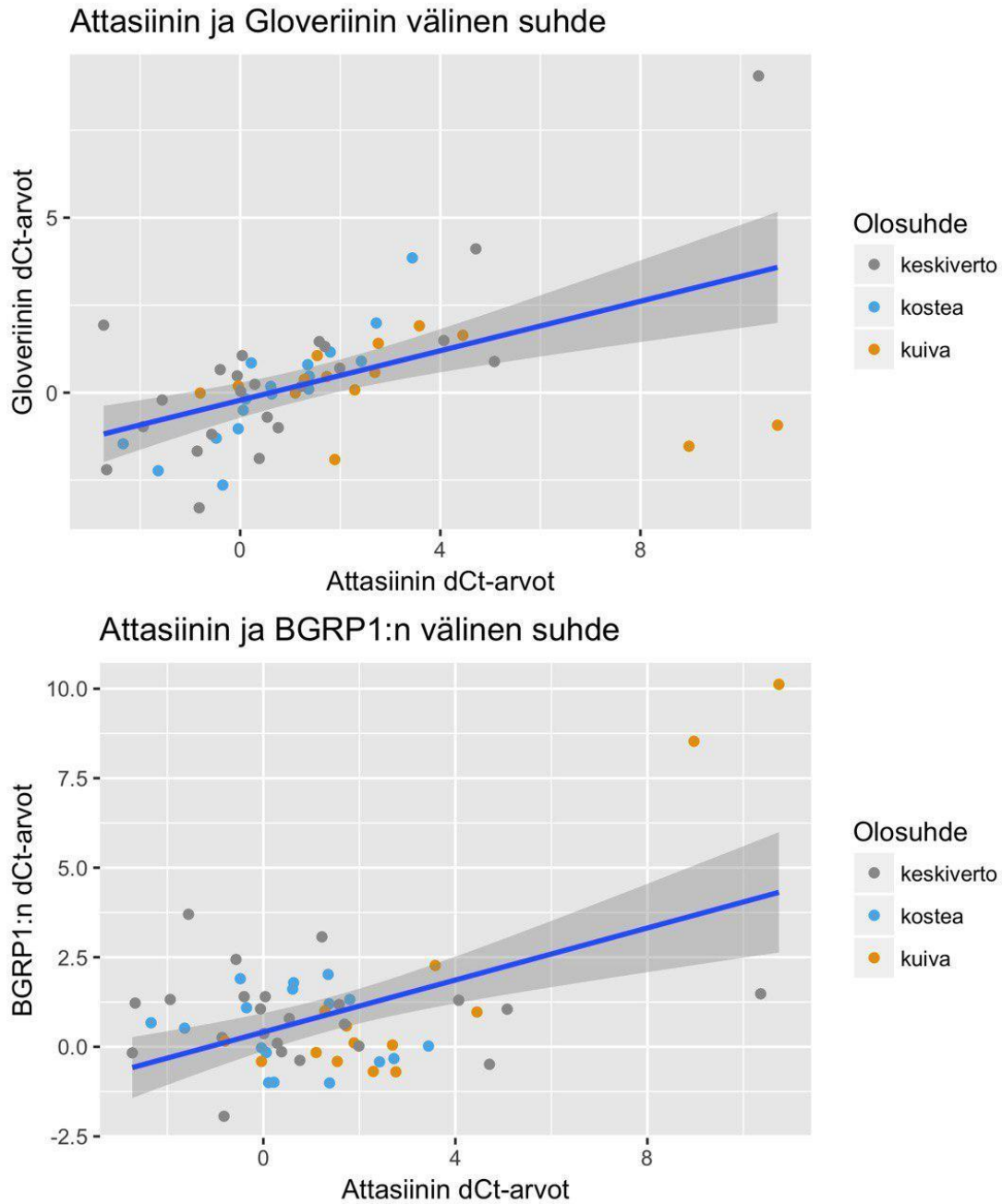
Kuva 7. Kaikkien immuunigeenien Δ Ct-arvojen ruutukaaviot. Tilastollisesti merkitsevät erot merkitty tähdellä (* $P < 0.05$). Attasiinin ilmentyminen kuivissa olosuhteissa on matalampaa kuin keskiverroissa tai kosteissa olosuhteissa.

Attasiinin ja gloveriinin Δ Ct-arvojen välillä on lievä positiivinen korrelaatio ($T = 0,45$, $R^2 = 0,27$, $p = 6,189e-05$) (Taulukko 15, Kuva 8). Samoin attasiinin ja β GRP1:n Δ Ct-arvojen välillä on lievä positiivinen korrelaatio ($T = -0,01$, $R^2 = 0,24$, p-arvo = $9,433e-05$)

(Taulukko 15, Kuva 8). Koska Kendallin korrelaatiokerroin on attasiinin ja β GRP1:n välillä $T = -0.01$ lineaariregressiossa nähdään näennäinen lineaarinen suhde, johon vaikuttavat suuret poikkeavat arvot (Kuva 8). Jos poikkeavat arvot poistettaisiin, suhdetta ei näkyisi. Gloveriinin ja β GRP1:n Δ Ct-arvojen välillä ei ole lineaarista suhdetta, kuten ei myöskään muiden geeniparin välillä (Taulukko 15).

Taulukko 15. Kendallin järjestyskorrelaatiokerroin ja lineaariregression tulokset immuunigeenien väliselle suhteelle.

Kendall korrelaatiokerroin	Attasiini	Gloveriini	β GRP1	ProPO
Attasiini	1			
Gloveriini	0.45	1		
β GRP1	-0.01	-0.06	1	
ProPO	0.00	0.03	0.03	1
Lineaariregression p-arvo				
Attasiini	1			
Gloveriini	6,19E-05 ***	1		
β GRP1	9,43E-05 ***	0,510	1	
ProPO	0,604	0,814	0,642	1



Kuva 8. Attasiinin ja gloveriinin, sekä attasiinin ja β GRP1:n Δ Ct-arvojen välinen lineaariregressio. Temma alue kuvaa 95% luottamusväliä. Attasiinin ja gloveriinin välinen korrelaatio on lievästi positiivinen ($T = 0,45$). Attasiinin ja β GRP1:n välinen korrelaation syntyy poikkeavista havainnoista, todellista korrelaatiota ei ole ($T = -0,01$). Kummatkin korrelaatiot ovat tilastollisesti merkitseviä (Taulukko 15).

5.6.2. Sukupuolten välinen vertailu

Aineistossa naaraita oli 14 ja koiraita 41 (Taulukko 16). Sukupuolten välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero proPO:n ilmentymisessä ($W = 127$, $p = 0,002$) (Taulukko 17). Naaraissa proPO:n ilmentyminen oli noin kaksikertaista koiraisiin verrattuna (Taulukko 17, Kuva 9). Muiden geenien kohdalla ilmentymisessä ei sukupuolien välillä ollut tilastollisesti merkitsevää eroa Mann-Whitneyn U-testin p-arvojen perusteella (Taulukko 17). Luottamusvälianalyysin perusteella attasiinissa ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa sukupuolten välillä (Taulukko 17). Gloveriini- ja β GRP1-geenien ilmentymisen kohdalla luottamusväli ei sisällä nollaa (Taulukko 17). Molemmien geenin kohdalla keskiarvojen erotuksen vaihteluvälin ääripäät ovat laskennallisesti pieniä eroja, mutta ne saattaisivat tuottaa suuremmassa aineistossa pienen eron. Luottamusvälille mahtuvat erot suurimmillaan vastaavat yli puoliksi vähentynyttä (gloveriini) tai alle kaksinkertaista kohonneisuutta (β GRP1) sukupuolten välillä. Biologisesti lähes kaksikertainen tai puolittunut ero immuunigeenien ilmentymisessä olisi merkittävä. Tutkimusaineistossa β GRP1-geenin ilmentyminen eroaa niin, että naaraissa geeni ilmentyy puolitoista kertaa enemmän kuin koiraisissa. Gloveriini-geenin ilmentyminen eroaa niin, että naaraissa geeni ilmentyy noin puolitoistakertaa vähemmän kuin koiraisissa. Nämäkin erot voivat vahvistua suuressa aineistossa tilastollisesti merkittäviksi eroiksi ja ne olisivat biologisesti merkittäviä, sillä puolitoistakertainen ero geenin perustason ilmentymisessä voi kuvata eroa sukupuolten välillä. Luottamusvälianalyysi vahvistaa suuren eron proPO:n ilmentymisessä sukupuolten välillä (Taulukko 17).

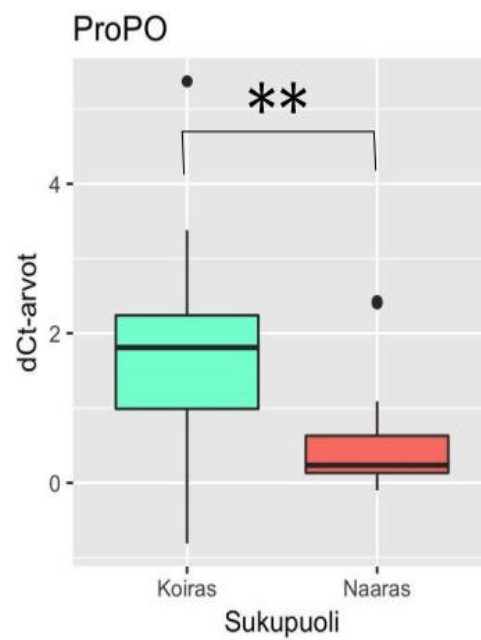
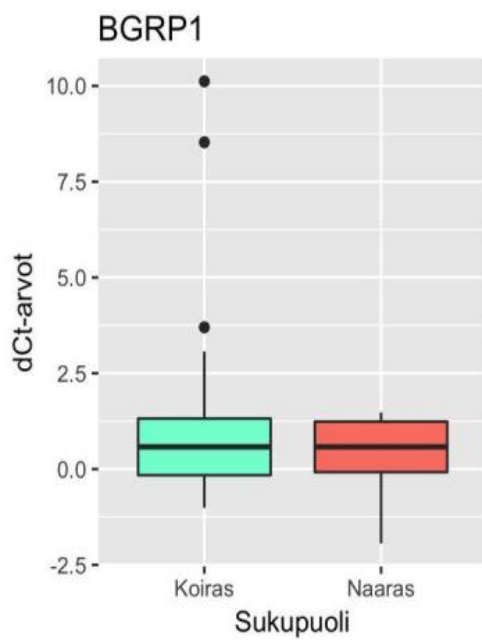
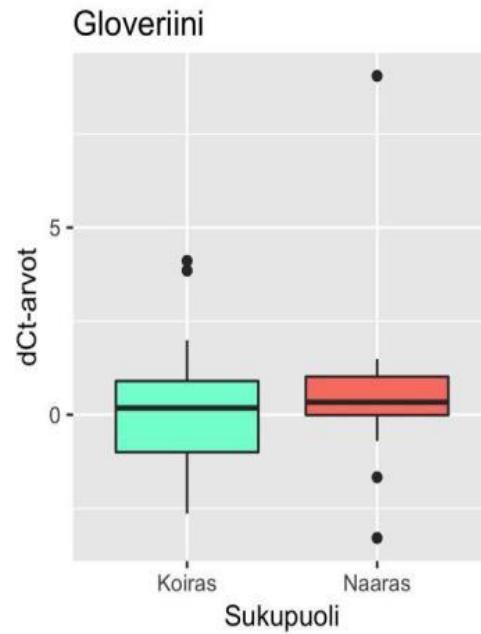
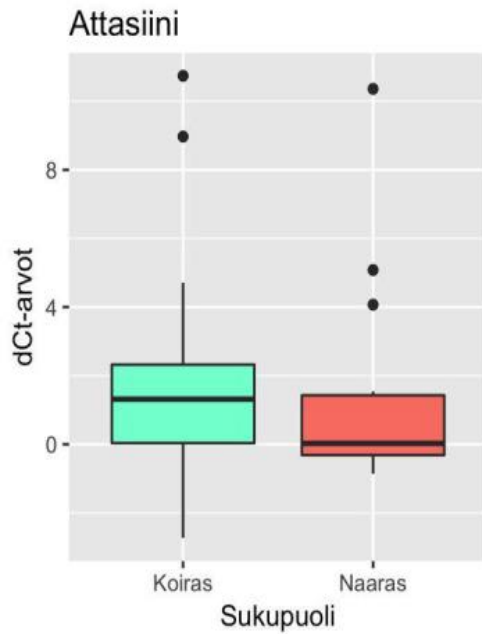
Taulukko 16. Naaraiden ja koiraiden määrä aineistossa.

	Otoskoko	Naaraita	Koiraita
Kuiva	14	4	10
Keskiverto	24	10	14
Kostea	19	0	19

Taulukko 17. Sukupuolten väliset erot immuunigeenien ilmentymisessä.

$\Delta\Delta C_t$ ja 95% luottamusväli	Attasiini	Gloveriini	β GRP1	ProPO
--	-----------	------------	--------------	-------

Naaras/Koiras	0,04 (-0,24, 0,32)	0,53 (0,29, 0,77)	-0,59 (-0,86, -0,32)	-1,08 (-1,35, -0,80)
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,97	0,69	1,51	2,11
Log2 FC	-0.04	-0.53	0.59	1.08
p-arvo	0,364	0,595	0,854	0,002 **



Kuva 9. ProPO:n ΔC_t -arvot jaoteltuna sukupuolittain. ProPO ilmenee naaraissa lähes kaksinkertaisesti koiraisiin nähden ($P^{**} < 0.01$). Naaraita on määrällisesti vähemmän ($n = 14$) kuin koiraita ($n = 41$).

5.7. Enkapsulaatiokoe

5.7.1. Enkapsulaatioarvot olosuhteittain

Enkapsulaatioarvo kuvaa enkapsulaatiokokeessa perhoseen asetetun filamentin ympärille muodostuneen melanisoituneen kerroksen harmautta eli sen paksuutta. Suurempi arvo tarkoittaa suurempaa melanisaatiota. Enkapsulaatioarvot eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi eri olosuhteissa tai sukupuolittain (Taulukko 18). Studentin T-testi vahvistaa, että näytteiden keskiarvot eivät eronneet merkittävästi toisistaan. Kaikissa kolmessa parissa (Kuiva-Keskiverto: $p = 0,91$, Kuiva-Kostea: $p = 0,64$, Keskiverto-Kostea: $p = 0,43$). Sukupuolien välillä ei myöskään ole merkittävää eroa ($p = 0,91$).

Taulukko 18. Enkapsulaatioarvojen tilastollisia tunnuslukuja olosuhteittain ja sukupuolittain.

	Keskiarvo	Keskihajonta	Keskivirhe	95% Luottamusväli		Otoskoko
Kuiva	112	28	7	98	127	14
Keskiverto	115	19	4	108	122	28
Kostea	109	20	5	100	117	19
Naaras	113	26	7	100	126	15
Koiras	112	20	3	106	118	46

Taulukko 19. Luottamusvälianalyysi.

	Keskiarvojen erotus	Alaraja	Yläraja
Kuiva/Keskiverto	-2	-4	-1
Kuiva/Kostea	4	2	6
Keskiverto/Kostea	6	5	9
Naaras/Koiras	1	-1	2

Vaikka kosteusolosuhteiden välillä laskettujen keskiarvojen erotuksen luottamusväleille ei mahdukaan nollaa, ovat ala- ja ylärajat todella pieniä (Taulukko 19). Näin pienillä eroilla enkapsulaatiokokeessa ei olisi fysiologisesti merkitseviä eroja.

5.7.2. Enkapsulaatioarvojen ja immuunigeenien ilmentymisen välinen suhde

Saatuja enkapsulaatioarvoja verrattiin immuunigeenien ΔCt -arvojen kanssa. Kaikkien kohdalla Kendallin järjestyskorrelaatiokerroin oli pieni ja lineaariregressioanalyysi vahvisti, että arvojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää lineaarista suhdetta (Taulukko 20).

Taulukko 20. Enkapsulaatioarvojen ja immuunigeenien ΔCt -arvojen välinen korrelaatio ja lineaarinen suhde.

	Korrelaatio (Kendall)	Lineaariregressio (p-arvo)
Attasiini - Enkapsulaatio	-0.08	0.438
Gloveriini - Enkapsulaatio	0.05	0.590
βGRP1 - Enkapsulaatio	-0.04	0.734
ProPO - Enkapsulaatio	0.00	0.246

6. Tulosten tarkastelu

6.1. Immuunigeenien ilmentymistasot

Tutkimuksen päätarkoituksena oli selvittää immuunigeenien ilmentymisen eroja eri kosteusolosuhteista peräisin olevilla perhosilla. Tutkimusaineistona oli Panaman luonnonpopulaatioista kerätyt *Heliconius erato* -perhosyksilöt, jotka pyydystettiin alueilta, joiden kosteusolosuhteissa oli pitkäaikaisseuranta-aineiston perusteella merkittäviä eroja (BioDB Smithsonian Tropical Research Institute 2018). Maaperän kosteus vaikuttaa alueen mikrobiomiin ja mikrobiomin toimintoihin kuten maahengitykseen, ja maahengitys vaikuttaa useisiin tekijöihin kuten ravintoaineiden saatavuuteen (Moyano et al. 2013, Hawkes et al. 2017). Maaperän kosteus vaikuttaa mikro-organismien ja sienien määrään ja laatuun (Borowik & Wyszowska 2016, Zumsteg et al 2013, Zhang et al 2014). Lisäksi

useissa tutkimuksissa on todettu kosteusolosuhteiden vaikuttavan kuolleisuuteen parasiitteja tai taudinaiheuttajia kohtaan (Mostafa et al. 2005, Mishra et al. 2015, Rohde et al. 2010, Toledo et al. 2014, Reilly et al. 2014).

Tutkimuksessa valittujen immuunigeenien ilmentymistä mitattiin qPCR:llä. qPCR:ää käytetään immuunigeenien ilmentymistasojen mittaamiseen laajasti. qPCR:n etuna immuunigeenien kvantifioinnissa on qPCR:n sensitiivisyys, eli myös matalasti ilmentyneen geenit, joita immuunigeenit tyypillisesti ovat, voidaan tunnistaa näytteessä.

Immuunigeenien ilmentymisessä kosteusolosuhteiden välillä oli tilastollisesti merkitsevää eroa vain attasiinin kohdalla kuivissa olosuhteissa. Attasiinia oli ilmentynyt kuivissa olosuhteissa noin neljä kertaa vähemmän kuin keskiverroissa olosuhteissa ja viisi kertaa vähemmän kuin kosteissa olosuhteissa. Attasiini on antimikrobiaalinen peptidi (AMP), joka on aktiivinen erikoisesti gram-negatiivisia bakteereita vastaan ja on yhdistetty Toll-kaskadin aktivoitumiseen (Tzou et al. 2002). Toisille AMP-geeneille tehdyt qPCR-kokeet ovat näyttäneet AMP-geenien ilmentymisen kasvavan nopeasti infektion aikana ja pysyvän korkeana yli 24 tuntia aktivaatiosta (Lavine et al. 2005). Usean erirakenteisen AMP-geenin samanaikainen aktivoituminen voi tarjota laajemman suojan patogeenejä vastaan (He et al. 2015, Bolouri et al. 2016, Tzoue et al. 2002). Attasiinin ja gloveriinin, joka on myös AMP-geeni, ilmentyminen oli lievästi positiivisesti korreloitunut, eli matala ilmentymistaso attasiinissa tarkoittaa mahdollisesti myös laskenutta ilmentymistasoa gloveriinissa. Gloveriinilla ja attasiinilla saattaa olla yhteisiä säätelytekijöitä, mutta sitä ei ole kokeellisesti todettu.

β GRP1 on tunnistajaproteiini, joka tunnistaa Gram-positiivisia ja -negatiivisia bakteereja ja useita hiivoja (Ma & Kanost 2000). β GRP1 aktivoi *M. sexta* -lajissa PO-kaskadin toiminnan (Ma & Kanost 2000). β GRP1-geeniä oli ilmentynyt kuivissa olosuhteissa noin kaksi kertaa vähemmän kuin kosteissa olosuhteissa, mutta ero ei saavuttanut tilastollista merkitsevyyttä. Luottamusvälianalyysin perusteella 95%:n luottamusvälille mahtuu myös merkittävästi eroavia arvoja. On mahdollista, että β GRP1:n ilmentymisessä eri

koskeusolosuhteissa on todellinen ero jota ei saada kuvattua kosteusolosuhteiden välillä otokseen valikoituneiden yksilöiden tai otoskoon takia.

Havaitut erot immuunigeenien ilmentymisessä voivat olla seurausta siitä, että kosteusolosuhteiden väliset immuuniuhkat eroavat toisistaan määrällisesti tai laadullisesti. Kuivien olosuhteiden yksilöissä ilmentyy tilastollisesti merkitsevästi vähemmän vain attasiinia. Kosteusolosuhteet ympäristössä vaikuttavat useisiin tekijöihin. Koska muiden geenien ilmentyminen ei ollut alentunut, ei tämän tutkimuksen perusteella voida todeta laajemman immuunivasteen olevan alhaisempi kuivissa olosuhteissa. Tutkimuksen perusteella voidaan kuitenkin kysyä onko kosteusolosuhteiden välillä eroa patogeeneiden tyypissä. Koska attasiini aktivoituu nimenomaisesti Gram-negatiivisia bakteereja vastaan (Tzou et al. 2002), voi kuivissa ympäristöissä olla pienempi todennäköisyys kohdata gram-negatiivisia bakteereja. Tutkittu satunnaisotos kuivista olosuhteista on joko voinut kohdata vähemmän attasiinin kasvaneeseen ilmentymiseen johtavia patogeenejä tai sen ympäristössä on mahdollisesti määrällisesti vähemmän attasiinin ilmentymiseen johtavia patogeenejä.

Immuunigeenien ilmentymisen vertailu sukupuolten välillä tuotti tilastollisesti merkitsevän eron proPO:n ilmentymisessä ($p = 0,002$). Naaraissa proPO:n ilmentyminen oli noin kaksikertaista koiraisiin verrattuna. ProPO:n ilmentymisen vaihtelu sukupuolten välillä on kuvattu ilmiönä aiemmin (Yamamoto et al. 2000, Barthel et al. 2015). Naaraat ja koiraat kohtaavat eri määrän immuuniuhkia ja niiden käytös eroaa huomattavasti (Barthel et al. 2015). Naaraat kuluttavat valtaosan aikuisiästään munimiseen ja munimispaikkojen etsimiseen ja käyttävät suuren määrän energiaa ja ravintoa munien tuotantoon (Barthel et al. 2015, Chauhan et al. 2016, Jiggins 2017). Vaikka PO-kaskadi on yliaktiivisena haitallinen (Söderhall et al. 1998), saattaa naarailla olla enemmän syytä ylläpitää suurempaa proPO:n määrää. Chauhan et al. (2015) totesivat useiden PO-kaskadin komponenttien olevan korkeammin ilmentyneitä naaraissa, mukaanlukien proPO:n. Syiksi immuunivasteen eroihin naaraiden ja koiraiden välillä Chauhan et al. (2015) ehdottavat parittelussa naaraille tapahtuvat vauriot ja sukupuolitautilien leviämiseen. Barthel et al. (2015) totesivat *Heliothis virescens* -koiperhosen koiraiden ylläpitävän korkeampaa perustason immuunigeeni-

ilmentymistä kuin naaraat, ja naaraiden nostavan immuunigeeni-ilmentymistä voimakkaammin bakteeriuhkkan kohdattuaan. Chauhan et al. (2016) vahvistivat tämän tuloksen *Ischnura elegans* -korennossa. Tässä tutkimuksessa naaraiden gloveriini ilmentyminen oli tutkimuksen perusteella 1.45 kertaa koiraita matalampaa ja β GRP1 ilmentyminen 1.51 kertaa korkeampaa, mutta ero ei saavuttanut tilastollista merkitsevyyttä. Koska β GRP1 on immuunivastetta käynnistävä tunnistajaproteiini, tämä voisi kuvata naaraiden valmiutta korkeampaan immuunivasteeseen. Sekä gloveriinin, että β GRP1 ilmentymisen luottamusvälianalyysissä keskiarvojen erotuksen välille ei mahtunut nollaa ja on mahdollista, että ero on todellinen ja paljastuisi isommassa otoskoossa.

6.2. Enkapsulaatiokoe

Immuunigeenien ilmentymisen tutkimisen lisäksi tutkimuksessa haluttiin selvittää enkapsulaation määrällistä vaihtelua kosteusolosuhteittain. Enkapsulaatio on hyönteisille tyypillinen soluvälittäisen immuunipuolustuksen reaktio. Enkapsulaatiossa vierastekijän ympäröi suuri määrä immuunisoluja, jotka piirittävät sen, tuhoutuvat ja vapauttavat sytotoksisia tekijöitä sekä melaniinina. Tuloksena vierastekijän ympärille muodostuu paksu kapseli, joka eristää vierastekijän hemolymfasta. Enkapsulaatioreaktion voimakkuutta mitataan asettamalla muovifilamentti hyönteisen keskiruumiiseen ja mittaamalla sen ympärille muodostuvan kerroksen paksuutta. Aiemmissa tutkimuksissa on näytetty enkapsulaatioarvojen vaihtelevan yksilöiden välillä eri olosuhteissa (Baer et al. 2006, Saastamoinen & Rantala 2013, Prokkola et al. 2013). Tässä tutkimuksessa enkapsulaatioarvot eivät merkittävästi eronneet toisistaan kosteusolosuhteiden vertailussa tai sukupuolten välillä. Lisäksi, vaikka PO-kaskadi on melanisaation käynnistävä tekijä proPO:n qPCR:llä mitattu ilmentymisen määrä ei korreloinut enkapsulaatioarvojen kanssa. ProPO on fenolo-oksideasin (PO) proentsyymi, joka on inaktiivisessa muodossaan perhosen hemolymfassa (Dubovskiy et al. 2016). ProPO:a aktivoivat proteinaasit (PAP) yhdessä kofaktorien kanssa muuttavat proPO:n sen aktiiviseen muotoon (Jiang et al. 1998, Jiang et al. 2003). Myöskään PAP:t ovat hemolymfassa inaktiivisessa muodossa (Dubovskiy et al. 2016). PAP:iden aktivointiin saattaa liittyä myös monimutkainen aktivointiketju ja säätelyä ennen ja jälkeen transkription (Jiang et al. 2003, Yamamoto et al. 2000). β GRP1 on yksi PAP:ien aktivointiin johtavia tunnistajaproteiineja (Ochiai &

Ashida 1988, Ma & Kanost 2000). Myös β GRP1:n ilmentyminen qPCR:llä mitattuna ei korreloinut enkapsulaatioarvojen kanssa. PO-kaskadin toiminta tuottaa soluille vaarallisia melanisaation sivutuotteita, kuten happiradikaaleja (Söderhall et al. 1998). Myös sen inhibitio on tarkasti säädeltyä (Söderhall et al. 1998). Langeloh ym (2012) totesivat tutkimuksessaan, että PO-järjestelmä saattaa olla tasapainoittavan valinnan alla ja siinä on yksilöiden välillä vähemmän vaihtelua.

Tutkimuksessa käytetty aluke kohdistui proPO:n toiseen alayksikköön ja proPO:lla on *B. mori* -lajissa ainakin kaksi isoformia (Yamamoto et al. 2000, Asano & Ashida 2001). Jokainen isoformi koostuu ainakin kahdesta alayksiköstä (Asano & Ashida 2001) ja sen uskotaan olevan heterodimeeri (Clark & Strand 2013). On mahdollista, että tämä alayksikkö oli huono kohde. Se on ainoa tunnettu proPO-geeni LepBase-tietokannassa. ProPO ei näiden tuloksien perusteella ole rajoittava tekijä melansaation määrässä. Clark ja Strand (2013) tunnistivat enkapsulaation mahdolliseksi rajoittavaksi tekijäksi PO-entsyymien substraatteja.

6.3. Tutkimusasetelman mahdolliset ongelmat

6.3.1. Kosteusolosuhteet

Kosteusolosuhteet vaihtelevat alueiden sisällä ja esimerkiksi keskiverrot ja kosteat olosuhteet eroavat toisistaan varsin vähän maaperän kosteusmittauksissa. Siinä missä kuivien alueiden keskiarvo oli 14.3, keskivertojen oli 24 ja kosteiden 26.9 (Taulukko 1). On mahdollista, että keskivertojen ja kosteiden alueiden välinen ero kosteusolosuhteissa ei ollut riittävä aiheuttaakseen mitattavaa eroa tutkituissa immuunigeeneissä vaikka sellainen olisi korkeammissa kosteuseroissa. Tutkimukseen valikoidut alueet valittiin pitkäaikaisten seurantatietojen perusteella, joiden mukaan alueiden välillä oli huomattavia eroja kosteusolosuhteissa.

Populaatiot eri alueilla ja eri olosuhteissa voivat olla eri tavalla sopeutuneet ja valitut geenit eivät kattaneet riittävää alaa erojen määrittämiseen. Neljän geenin tutkiminen ei riitä laajaan kuvaan perhosten ympäristöstä, sen vaikutuksesta immunitetista tai immunitettiin

yleisesti. Koiraita ja naaraita ei ollut riittävästi kosteusolosuhteittain, jotta naaraiden ja koiraiden eroja voitaisiin vertailla alueittain. Kuivilla alueilla naaraita oli vain neljä yksilöä ja kosteilta ei lainkaan.

6.3.2. Normalisointi qPCR-työssä

H. erato -lajin heikon sekvenssitiedon takia alukkeiden suunnittelu oli haastavaa. Kaikkia haluttuja kohteita ei löytynyt edes alustavasti annotoituna, mikä rajoitti mahdollisten tutkimusgeenien valintaa ja määrää. Koska lajille ei ole aiemmin määritelty luotettavia kontrolligeenejä, olisi tutkimukseen pitänyt valita suurempi määrä alustavia kontrolligeenejä ja niiden määrittämisen osuutta tutkielmassa laajennettava. eIF4A ja GAPDH olivat paras tarjolla oleva kontrolligeenipari. Pro gradu -työhön ei voitu lisätä laajempaa kontrolligeenien määrittystä. Koska kontrolligeeneillä normalisointi vaikuttaa määrittämistarkkuuteen ja tutkielman kontrolligeenit eivät olleet määrittelyalgoritmien perusteella toiminnaltaan riittävän samanlaisia eri olosuhteissa, tutkimuksen tarkkuus saattoi kärsiä. Kuivalta alueelta yksilöitä oli 14, keskiverroilta 23 ja kosteilta 17. Pieni satunnaisotos voi poiketa paljon todellisesta perusjoukosta. Tyypin I -virhe, eli väärä positiivinen tulos, ja myös tyypin II -virhe eli väärä negatiivinen tulos ovat mahdollisia.

6.4. Yhteenveto

Tämä tutkimus käsittelee neljän immuunigeenin ilmentymisen eroja *H. erato* -perhosessa kolmessa eri kosteusolosuhteessa. Muutamankin geenin tuottamat tulokset ovat suuntaa-antavia ja saattavat kieliä laajemmasta ilmiöstä. Tämän tutkimuksen pohjalta voidaan sanoa, että erityisesti attasiinia ilmentyy vähemmän kuivien kuin kosteiden ja keskivertojen olosuhteiden yksilöissä. Maaperän kosteusolosuhteet vaikuttavat mikrobien määrään ja laatuun, sekä mikrobien tuottaman maahengityksen määrään (Borowik & Wyszowska 2016, Moyano et al. 2013, Hawkes et al. 2017). Maahengitys vuorostaan vaikuttaa useisiin abioottisiin ja biottisiin tekijöihin (Moyano et al. 2013, Hawkes et al. 2017). Maaperän ja ympäristön kosteus vaikuttaa kuolleisuuteen joihinkin patogeeneihin ja sieniin useissa hyönteislajeissa. On mahdollista, että attasiiniin ilmentymiseen johtavia tekijöitä oli kuivissa olosuhteissa vähemmän tai, että kuivan alueen populaatio on sopeutunut investoimaan vähemmän attasiinin tuotantoon kuin kosteilla alueilla. Laajemmin, tutkimus

antaa kuvaa immuunitekijöiden vaihtelusta eri olosuhteista ja ominaisuuksista riippuen. Naaraiden ja koirasten välillä oli tilastollisesti merkitsevät ero proPO:n ilmentymisessä, joka voi kuvata niiden elämänhistorian eri tapahtumia ja niiden asettamia vaatimuksia. Kosteusolosuhteet ja niiden vaikutus eri elämänhistorian mekanismeihin ansaitsevat laajempaa tutkimusta.

7. Tulevaisuus

Ilmastonmuutoksen oletetaan aiheuttavan laajamittaisia muutoksia kosteusolosuhteisiin ja aiheuttavan useampia poikkeuksellisia sääilmiöitä. Kosteusolosuhteiden muutokset pitkäjäksoisesti tai toistuvasti voivat vaikuttaa useisiin luonnonpopulaatioihin arvaamattomalla tavalla. Aiheeseen liittyvien jatkotutkimuksien tulisi tutkia kosteusolosuhteiden vaihtelua suuremmalla otoskoollla. Jos jatkotutkimuksissa halutaan selvittää eroja immunitetissa laajemmin ja pidättäytyä qPCR-metodissa, kosteusolosuhteiden välillä olisi hyvä keskittyä nimenomaisesti AMP-geenien ilmentymiseen. AMP-geenien ilmentymisen syy-seuraus-suhde on selvä, suurempi määrä proteiinia tappaa enemmän bakteereja. Jos taas halutaan tutkia naaraiden ja koiraiden välisiä eroja, on syytä valita tunnettuja tunnistajaproteiineja AMP-geenien lisäksi. Naaraiden ja urosten välisten erojen selvittämisessä olisi hyvä tutkia useita erilaisia immunitetin prosesseja kokonaisvaltaisesti, jolloin mikrosirutekniikka voisi olla parempi metodi. Aiemmissa tutkimuksissa eri lajeilla naaraiden immuunivaste on korkeampi kuin koiraiden, ja koiraiden immuunigeeni-ilmentymisen perustaso on korkeampi. Tutkimalla tunnistajaproteiineja ja AMP:itä voisi mahdollisesti vahvistaa tämän tuloksen *H. erato* -perhosella. Jos enkapsulaation voimakkuuden ja immuunigeenien ilmentymisen välillä halutaan etsiä suhdetta, yksi tai useampi proPO:n aktivaattoreista tai sen inhibiittoreista olisi jatkotutkimuksissa parempi kohde kuin proPO.

8. Kiitokset

Erittäin suuret kiitokset tutkielmani ohjaajille FT Anniina Mattilalle ja FT Johanna Kurkolle. Kiitos myös Toshka Nymannille ja Annukka Ruokolaiselle henkisestä tuesta

sekä avusta tutkielman laboratorio-osuuden aikana, ja professori Frank Jigginsille hyvistä neuvoista.

Lähteet:

1. Adamo, S. A., Roberts, J. L., Easy, R. H., Ross, N. W. (2008) Competition between immune function and lipid transport for the protein apolipophorin III leads to stress-induced immunosuppression in crickets. *Journal of Experimental Biology* 2008 211: 531-538.; doi: 10.1242/jeb.013136
2. Adamo, Shelley A., and Maggie M. E. Lovett. (2011) Some like it hot: the effects of climate change on reproduction, immune function and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Experimental Biology* 214.12 (2011): 1997-2004. Web. 19 July. 2017.
3. An, C., Jiang, H., & Kanost, M. R. (2010). Proteolytic activation and function of the cytokine Spätzle in the innate immune response of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *FEBS Journal*, 277(1), 148–162. Retrieved from <http://10.0.4.87/j.1742-4658.2009.07465.x>
4. Andersen C.L., Ledet-Jensen J., Ørntoft T. (2004) Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. [*Cancer Research*](#). 2004 (64): 5245-5250.
5. Arias, M., Meichanetzoglou, A., Elias, M. et al. (2016) Variation in cyanogenic compounds concentration within a *Heliconius* butterfly community: does mimicry explain everything? *BMC Evol Biol*, 2016, 16: 272.. doi:10.1186/s12862-016-0843-5
6. Arya, M., Sherqill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), pp. 209-219.
7. Baer, B. & Armitage, S. & Boomsma, J. (2006). Sperm Storage includes an immunity cost in ants. *Nature*. 441. 872-5. 10.1038/nature04698.
8. Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics*, 21(3), 389–395.
<http://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2005>

9. Barthel, A., Staudacher, H., Schmaltz, A., Heckel, D. G., & Groot, A. T. (2015). Sex-specific consequences of an induced immune response on reproduction in a moth. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 282. <http://doi.org/10.1186/s12862-015-0562-3>
10. Bel, Y., Ferré, J., & Escriche, B. (2011). Quantitative real-time PCR with SYBR Green detection to assess gene duplication in insects: study of gene dosage in *Drosophila melanogaster* (Diptera) and in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera). *BMC Research Notes*, 4, 84. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-4-84>
11. Benson, W. (1978). Resource Partitioning in Passion Vine Butterflies. *Evolution*, 32(3), 493-518. doi:10.2307/2407717
12. Bischoff, V., Vignal, C., Duvic, B., Boneca, I. G., Hoffmann, J. A., & Royet, J. (2006). Downregulation of the *Drosophila* Immune Response by Peptidoglycan-Recognition Proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathogens*, 2(2), e14. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020014>
13. BioGeODB Smithsonian Tropical Research Institute 2018 http://biogeodb.stri.si.edu/physical_monitoring/ Viitattu 31.08.2018.
14. Bolouri Moghaddam, M., Tonk, M., Schreiber, C., et al. (2016). The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides. *Biological Chemistry*, 397(9), pp. 939-945.
15. Borowik, A., Wyszowska, J. (2016). Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil. *Plant, Soil and Environment*, 62(No. 6), pp. 250-255.
16. Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Wittwer, C. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* Apr 2009, 55 (4) 611-622.
17. Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 19–28. <http://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
18. Casanova-Torres, Á. M., & Goodrich-Blair, H. (2013). Immune Signaling and Antimicrobial Peptide Expression in Lepidoptera. *Insects*, 4(3), 320–338. <http://doi.org/10.3390/insects4030320>

19. Challis, R. J., Kumar, S., Dasmahapatra, K. K. K., Jiggins, C. D., & Blaxter, M. (2016). Lepbase: the Lepidopteran genome database. *BioRxiv*. Retrieved from <http://biorxiv.org/content/early/2016/06/06/056994.abstract>
20. Chauhan, P., Wellenreuther, M., & Hansson, B. (2016). Transcriptome profiling in the damselfly *Ischnura elegans* identifies genes with sex-biased expression. *BMC Genomics*, 17, 985. <http://doi.org/10.1186/s12864-016-3334-6>
21. Choe, K.-M., Lee, H., & Anderson, K. V. (2005). Drosophila peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1122 LP-1126.
22. Clark, K. D., Strand M.R. (2013). Hemolymph melanization in the silkworm *Bombyx mori* involves formation of a high molecular mass complex that metabolizes tyrosine. *The Journal of biological chemistry*, 288(20), p. 14476.
23. De Spiegelaere, W., Dern-Wieloch, J., Weigel, R., Schumacher, V., Schorle, H., Nettersheim, D., ... Fink, C. (2015). Reference Gene Validation for RT-qPCR, a Note on Different Available Software Packages. *PLoS ONE*, 10(3), e0122515. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122515>
24. Dubovskiy, I. M., Kryukova, N. A., Glupov, V. V., & Ratcliffe, N. A. (2016). Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 13229-246.
25. Dziarski R, Gupta D. (2006) The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 2006;7(8) 232. doi:10.1186/gb-2006-7-8-232.
26. Engler-Chaouat, H. S. & Gilbert, L. E. (2007) De novo synthesis vs. sequestration: Negatively correlated metabolic traits and the evolution of host plant specialization in cyanogenic butterflies. *J. Chem. Ecol.* 33, 25-42 (2007).
27. EMBL-EBI Clustal Omega Viitattu 19.7.2018 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
28. Fargues, J. & Luz, C.(2000). Effects of Fluctuating Moisture and Temperature Regimes on the Infection Potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(3), pp. 202-211. ‘
29. Fassbinder - Orth, C. A. (2014). Methods for Quantifying Gene Expression in Ecoimmunology: From qPCR to RNA-Seq. *Integrative and Comparative Biology*, 54(3), pp. 396-406.

30. Ferrandon, D., Imler, J., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 7(11), 862-874.
31. Hawkes, C.V, Waring, B.G., Rocca, J.D., Kivlin S.N. (2017) Prior climate constrains current soil function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jun 2017, 114 (24) 6322-6327; DOI: 10.1073/pnas.1620811114
32. Hay-Roe, M.M. & Nation, J. J (2007) Spectrum of Cyanide Toxicity and Allocation in *Heliconius erato* and *Passiflora* Host Plants. *Chem Ecol* (2007) 33: 319.
33. He, Y. (2015). A genome-wide analysis of antimicrobial effector genes and their transcription patterns in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 62, p. 23.
34. Hedengren, M., BengtÅsling, Dushay, M. S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., & Hultmark, D. (1999). Relish, a Central Factor in the Control of Humoral but Not Cellular Immunity in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 4(5), 827–837. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80392-5](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80392-5)
35. Hoffman J.A. (2003). The immune Response of *Drosophila*. *Nature* 426: 33-38.
36. Integrated DNA Technologies PrimerQuest Tool 2012 Viitattu: 19.7.2018.
<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>
37. Integrated DNA Technologies UNAFold Viitattu 19.7.2018 <https://eu.idtdna.com/unafold>
38. Jiang, H. & Wang, Y. & Ma, C. & Kanost, M.R. (1997). Subunit Composition of Prophenol Oxidase from *Manduca sexta*: Molecular Cloning of Subunit ProPO-p1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 27. 835-850. 10.1016/S0965-1748(97)00066-0.
39. Jiang, H., Wang, Y., Yu, X., Kanost, M.R. (2003)Prophenoloxidase-activating Proteinase-2 from Hemolymph of *Manduca sexta* : A Bacteria-inducible Serine Proteinase Containing Two Clip Domains. *J. Biol. Chem.* 2003 278: 3552-.
doi:10.1074/jbc.M205743200
40. Jiggins, C. D. (2017). *The ecology and evolution of Heliconius butterflies* (First edition). Oxford: Oxford University Press.
41. Kang, D., Liu, G., Lundström, A., Gelius, E., & Steiner, H. (1998). A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 10078 LP-10082.

42. Kanost, M. R., Jiang, H. and Yu, X. (2004), Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, 198: 97-105. doi:[10.1111/j.0105-2896.2004.0121.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0121.x)
43. Khaliq, A., Javed, M., Sohail, M. & Sagheer, M. (2014). Environmental effects on insects and their population dynamics. *Journal Of Entomology And Zoology Studies*. 2. 1-7.
44. Kersey, P.J., Allen, J.E., Allot, A., Barba, M., Boddu, S., Bolt, B.J., Carvalho-Silva, D., Christensen, M., Davis, P., Grabmueller, C., Kumar, N., Liu, Z., Maurel, T., Moore, B., McDowall, M. D., Maheswari, U., Naamati, G., Newman, V., Ong, C.K., Bolser, D.M., De Silva, N., Howe, K.L., Langridge, N., Maslen, G., Staines, D.M., Yates, A. (2018) Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species *Nucleic Acids Research* 2018 46(D1) D802–D808 <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1011>
45. Kohl, M. (2007). SLqPCR: Functions for analysis of real-time quantitative PCR data at SIRS-Lab GmbH. SIRS-Lab GmbH, Jena. www.sirs-lab.com.
46. Kohl, M. (2018) SLqPCR: Functions for analysis of real-time quantitative PCR data at SIRS-Lab GmbH. Viitattu: 19.7.2018.
<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/SLqPCR/inst/doc/SLqPCR.pdf>
47. Langeloh, L., Behrmann-Godel, J. and Seppälä, O. (2017), Natural selection on immune defense: A field experiment. *Evolution*, 71: 227-237. doi:[10.1111/evo.13148](https://doi.org/10.1111/evo.13148)
48. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-8
49. Lavine, M.D. & Strand, M.R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 32, Issue 10, 2002,1295-1309
50. Lavine, M.D., Chen, G., Strand M.R. (2005) Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(12), pp 1335-1346.
51. Liu, G., Qiu, X., Cao, L., Zhang, Y., Zhan, Z., & Han, R. (2016). Evaluation of Reference Genes for Reverse Transcription Quantitative PCR Studies of Physiological Responses in

- the Ghost Moth, *Thitarodes armoricanus* (Lepidoptera, Hepialidae). *PLoS ONE*, 11(7), e0159060. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0159060>
52. Livak, K. J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), pp. 402-408.
 53. Ma, C. & Kanost, M.R. (2000) A β 1,3-Glucan Recognition Protein from an Insect, *Manduca sexta*, Agglutinates Microorganisms and Activates the Phenoloxidase Cascade. *J. Biol. Chem.* 275: 7505-. doi:10.1074/jbc.275.11.7505
 54. McMillan, W. O., Jiggins, C. D., & Mallet, J. (1997). What initiates speciation in passion-vine butterflies? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8628–8633.
 55. Markham, N.R., Zuker, M. (2008) UNAFold. In: Keith J.M. (eds) *Bioinformatics. Methods in Molecular Biology™*, vol 453. Humana Press
 56. Michel, T., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J. A., & Royet, J. (2001). *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414, 756.
 57. Mikkola, K., & Rantala, M. J. (2010). Immune defence, a possible nonvisual selective factor behind the industrial melanism of moths (Lepidoptera). *Biological Journal Of The Linnean Society*, 99(4), 831-838. doi:10.1111/j.1095-8312.2010.01398.x
 58. Mishra, S., Kumar, P., Malik, A. (2015) Effect of temperature and humidity on pathogenicity of native *Beauveria bassiana* isolate against *Musca domestica* L. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*. 2015;39(4):697-704. doi:10.1007/s12639-013-0408-0.
 59. Moyano, F.E., Manzoni, S., Chenu, C. (2013) Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: An exploration of processes and models, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 59, 2013, Pages 72-85, ISSN 0038-0717, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.002>.
 60. Murdock CC, Paaijmans KP, Cox-Foster D, Read AF, Thomas MB. Rethinking vector immunology: the role of environmental temperature in shaping resistance. *Nature reviews Microbiology*. 2012;10(12):869-876. doi:10.1038/nrmicro2900.
 61. NormFinder (2015). Documentation for running NormFinder in R. https://moma.dk/files/newDocOldStab_v5.pdf Viitattu 19.7.2018.

62. Ochiai, M. & Ashida, M. (1988) Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 1988 263: 12056-.
63. Prokkola, J., Roff, D., Kärkkäinen, T., Krams, I., & Rantala, M. J. (2013). Genetic and phenotypic relationships between immune defense, melanism and life-history traits at different temperatures and sexes in *Tenebrio molitor*. *Heredity*, 111(2), 89-96.
doi:10.1038/hdy.2013.20
64. Piron Prunier, F., Chouteau, M., Whibley, A., Joron, M., & Llaurens, V. (2016). Selection of Valid Reference Genes for Reverse Transcription Quantitative PCR Analysis in *Heliconius numata* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Insect Science*, 16(1), 50.
<http://doi.org/10.1093/jisesa/iew034>
65. Rahmathull, V. K. & Kishor Kumar, C. M. & Angadi, B. S. & Sivaprasad, V. (2012). Influence of Weather Factors on Incidence and Intensity of Microsporidiosis in Silkworm (*Bombyx mori* L.). *Journal of Entomology*. 9. 266-273. 10.3923/je.2012.266.273.
66. Ratcliffe, N. A., & Gagen, S. J. (1977). Studies on the in vivo cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue and Cell*, 9(1), 73–85. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-8166\(77\)90050-7](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-8166(77)90050-7)
67. RefFinder 2012 <http://leonxie.esy.es/RefFinder/?type=reference> Viitattu: 19.7.2018.
68. Rohde, C., Moino, A., da Silva, M., Carvalho, F.D., & Ferreira, C.S. (2010). Influence of soil temperature and moisture on the infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 39(4), 608-611.
69. Reilly, J. R., Hajek, A. E., Liebhold, A.M., & Plymale, R. (2014) Impact of Entomophaga maimaiga (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on Outbreak Gypsy Moth Populations (Lepidoptera: Erebidae): *The Role of Weather Environmental Entomology* 2014 43 (3), 632-641
70. Saastamoinen, M., & Rantala, M. J. (2013). Influence of Developmental Conditions on Immune Function and Dispersal-Related Traits in the Glanville Fritillary (*Melitaea cinxia*) Butterfly. *PLoS ONE*, 8(11), e81289. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0081289>
71. Schmid-Hempel P. (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 2005;50:529–551.

72. Schmittgen, T. & Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protocols* 3(6): 1101-1108. *Nature protocols*. 3. 1101-8. 10.1038/nprot.2008.73.
73. Seppälä, O. (2015), Natural selection on quantitative immune defence traits: a comparison between theory and data. *J. Evol. Biol.*, 28: 1–9. doi:10.1111/jeb.12528
74. Smilanich, A., Langus, T.C, Doan, L., Dyer, L., Harrison, J., Hsueh, J. & Teglas, M.B. (2017). Host plant associated enhancement of immunity and survival in virus infected caterpillars. *Journal of Invertebrate Pathology*. 151. 10.1016/j.jip.2017.11.006.
75. Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1), 1-14. doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00183.
76. Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., et al. (2008) A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 1087-1110.
77. Tanaka, H., & Yamakawa, M. (2011). Regulation of the innate immune responses in the silkworm, *Bombyx mori*. *Invertebrate Survival Journal*, 8(1), 59-69.
78. Tavignot, R., Chaduli, D., Djitte, F., Charroux, B., & Royet, J. (2017). Inhibition of a NF- κ B/Diap1 Pathway by PGRP-LF Is Required for Proper Apoptosis during *Drosophila* Development. *PLOS Genetics*, 13(1), e1006569.
79. ThermoFisher Scientific Multiple Primer Analyzer Viitattu 19.7.2018
<https://tinylink.net/dA6b2>
80. Thornton, B. & Basu, C. (2011), Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 39: 145-154. doi:[10.1002/bmb.20461](https://doi.org/10.1002/bmb.20461)
81. Turner, J.R.G. (1971). Experiments on the Demography of Tropical Butterflies. II. Longevity and Home-Range Behaviour in *Heliconius erato*. *Biotropica*, 3(1), 21-31. doi:10.2307/2989703
82. Toledo, J., Sánchez J. E., Williams, T., Gómez, A., Montoya, P. & Ibarra, J.E. (2014) Effect of Soil Moisture on the Persistence and Efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) Against *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Larvae. *Florida Entomologist* 2014 97 (2), 528-533.
83. Tzou, P., Reichhart, J.-M., & Lemaitre, B. (2002). Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient

- Drosophila* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2152–2157. <http://doi.org/10.1073/pnas.042411999>
84. Unckless, R. L., & Lazzaro, B. P. (2016). The potential for adaptive maintenance of diversity in insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695), 20150291. <http://doi.org/10.1098/rstb.2015.0291>
 85. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug 1;40(15):e115.
 86. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002, 3(7):research0034.1-0034.11 <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034/> 1
 87. Woestmann, L., Kvist, J., Saastamoinen, M. (2017) Fight or flight? – Flight increases immune gene expression but does not help to fight an infection. *Journal of Evolutionary Biology*. 2017;30(3):501-511.. doi:10.1111/jeb.13007.
 88. Wu, K., Yang, B., Huang, W., Dobens, L., Song, H., & Ling, E. (2016). Gut immunity in Lepidopteran insects. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 65–74. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.010>
 89. Xie, F., Xiao, P., Chen, D. et al. Plant Mol Biol (2012) miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs 80: 75. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
 90. Xu, X.-X., Zhong, X., Yi, H.-Y., & Yu, X.-Q. (2012). *Manduca sexta* Gloverin Binds Microbial Components and is Active against Bacteria and Fungi. *Developmental and Comparative Immunology*, 38(2), 275–284. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2012.06.012>
 91. Yamamoto, K., Yakiyama, M., Fujii, M., Kusakabe, M., Koga, M., Aso, Y. & Ichihuro, M. (2000) Expression of Prophenoloxidase mRNA during Silkworm Hemocyte Development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64:6, 1197-1202, [10.1271/bbb.64.1197](http://doi.org/10.1271/bbb.64.1197)

92. Yu, X. and Kanost, M. R. (2002), Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *European Journal of Biochemistry*, 269: 1827-1834.
doi:[10.1046/j.1432-1033.2002.02830.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02830.x)
93. Zhang X, Barberán A, Zhu X, Zhang G, Han X (2014) Water Content Differences Have Stronger Effects than Plant Functional Groups on Soil Bacteria in a Steppe Ecosystem. *PLOS ONE* 9(12): e115798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115798>
94. Zhang, S., An, S., Li, S., Wu, F., Yang, Q., Liu, Y., Cao, J., Zhang, H., Zhang, Q., Liu, X. (2015) Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Gene*, Volume 555, Issue 2, 25 January 2015, Pages 393-402, ISSN 0378-1119, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.038>.
95. Zhu, X., Yuan, M., Shakeel, M., Zhang, Y., Wang, S., Wang, X., ... Li, J. (2014). Selection and Evaluation of Reference Genes for Expression Analysis Using qRT-PCR in the Beet Armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 9(1), e84730. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0084730>
96. Zumsteg, A. & Baath, E. & Stierli, B. & Zeyer, J. & Frey, B. (2013). Bacterial and fungal community responses to reciprocal soil transfer along a temperature and soil moisture gradient in a glacier forefield. *Soil Biology & Biochemistry*, 61, pp. 121-132.